



HAL
open science

Etude de la balance Excitation/Inhibition dans l'hippocampe d'une souris transgénique modèle de la maladie d'Alzheimer

Floriane Payet

► To cite this version:

Floriane Payet. Etude de la balance Excitation/Inhibition dans l'hippocampe d'une souris transgénique modèle de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. <NNT : 2024GRALV064>. <tel-05097492>

HAL Id: tel-05097492

<https://theses.hal.science/tel-05097492v1>

Submitted on 4 Jun 2025

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

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



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

Etude de la balance Excitation/Inhibition dans l'hippocampe d'une souris transgénique modèle de la maladie d'Alzheimer

Study of Excitatory/Inhibitory balance in the hippocampus of a transgenic mouse model of Alzheimer disease

Présentée par :

Floriane PAYET

Direction de thèse :

Fabien LANTE

MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Directeur de thèse

Alain BUISSON

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Co-directeur de thèse

Rapporteurs :

Hélène MARIE

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Provence et Corse

Paul-Antoine SALIN

DIRECTEUR DE RECHERCHE EMERITE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Thèse soutenue publiquement le **15 novembre 2024**, devant le jury composé de :

Catherine GHEZZI,

PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Présidente

Fabien LANTE,

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Hélène MARIE,

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Provence et Corse

Rapporteuse

Paul-Antoine SALIN,

DIRECTEUR DE RECHERCHE EMERITE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Rapporteur

Remy SADOUL,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES EMERITE, Université Grenoble Alpes

Examineur

Michel VIGNES,

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Montpellier

Examineur



Remerciements

A l'approche de la fin de mon doctorat, la rédaction de ce manuscrit est pour moi l'occasion d'exprimer ma profonde reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue durant la thèse.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de thèse. Les Docteurs **Hélène Marie** et **Paul-Antoine Salin**, en qualité de rapporteurs, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce manuscrit. Merci aux Professeurs **Catherine Ghezzi** et **Rémy Sadoul** en qualité d'examinateurs. Merci au Professeur **Michel Vignes**, en qualité d'examineur mais également en tant que membre de mon comité de suivi individuel. J'adresse également mes remerciements aux autres membres de mon jury de Comité de suivi individuel : Le Docteur **Jean-Marie Billard** et le Professeure **Sabrina Boulet**. Merci pour votre contribution et vos nombreux conseils au cours de mes trois CSI.

J'aimerais tout particulièrement remercier mon directeur de thèse **Fabien Lanté** pour son accompagnement tout au long de ces années. C'est grâce à tes cours, en troisième année de licence, que j'ai choisi de postuler au master de neurosciences à Grenoble. Dès mon premier stage de M1, tu m'as initiée aux fondements de l'électrophysiologie, puis tu m'as encouragé et soutenu lors de ma candidature au concours de l'école doctorale. Cela fait désormais quatre ans que j'ai la chance de bénéficier de ton encadrement, de tes conseils avisés, et de ta présence (d'ailleurs, même les enregistrements patch semblent mieux fonctionner quand tu es là). La relation entre un encadrant et un doctorant est parfois délicate à équilibrer, mais tu as su trouver la juste mesure, m'aidant à développer mon autonomie tout en favorisant mon initiative. Je tiens à te remercier pour ton investissement constant et ta disponibilité, même dans les périodes surchargées. Tu ne m'as pas seulement formation au niveau expérimental, tu m'as également permis de gagner en confiance et de m'améliorer en m'aidant à structurer mes idées et en affinant ma réflexion

scientifique. Merci de m'avoir fait confiance dès le début. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 12. Un merci tout particulier à **Alain Buisson** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Tes conseils, tant sur le plan expérimental que lors des présentations scientifiques, m'ont été d'une aide précieuse tout au long de ma thèse. Je te remercie également pour nos discussions avant de partir le soir, qui m'ont permis de prendre du recul sur les résultats obtenus et d'élargir mes perspectives.

Je souhaiterais remercier **Sylvie Boisseau** et **Eve Borel**, mes deux "mamans de bureau". J'ai eu énormément de chance de partager mes journées à vos côtés. Vous m'avez accueillie avec bienveillance et bonne humeur, toujours disponibles et à l'écoute. Dans les moments quelque peu délicats, quand le temps me manquait ou que je me confrontais à des protocoles inconnus, j'ai toujours pu compter sur vous. Que ce soit lors de nos pauses café matinales ou à travers nos discussions et fous rires, vous avez grandement contribué à rendre l'environnement de travail agréable et chaleureux. **Sylvie**, un immense merci pour le temps que tu m'as consacré pendant les expériences d'immuno et pour m'avoir offert un refuge au calme, loin de la chaleur grenobloise, pour rédiger ce manuscrit. **Eve**, je tiens à te remercier sincèrement pour ton aide précieuse dans les expériences où tu m'as épaulée, me faisant ainsi gagner un temps précieux. Merci pour votre gentillesse, vos conseils et votre soutien.

Je souhaiterais remercier **Mireille Albrieux**. Aux côtés de Fabien, ce sont tes cours sur les astrocytes, en troisième année de licence (avec ces fameuses diapositives à fond noir et écriture blanche à l'époque), qui m'ont pour la première fois donné l'envie de m'inscrire en master de neurosciences. Il y a déjà six ans, **Adrien** et toi m'avez accompagné lors de mes premiers pas en électrophysiologie. Je te remercie pour ta bienveillance, ta disponibilité, et ton investissement, notamment dans la gestion des animaux et la résolution des nombreux petits défis propres à l'électrophysiologie. Un grand merci également à **Muriel Jaquier-Sarlin**. Ta bonne humeur constante, tes conseils et ta gentillesse ont grandement contribué à rendre l'atmosphère de travail à la fois agréable et stimulante.

Je tiens à adresser un mot de remerciement à tous les enseignants-chercheurs de l'équipe que j'ai eu la chance d'avoir en cours. En participant à mes premières expériences d'enseignement à vos côtés, j'ai pris conscience de l'investissement considérable que demande cette double casquette d'enseignant et de chercheur. Certains de vos cours ont véritablement façonné des parcours professionnels, et c'est notamment grâce à vous que mon propre projet a pris forme.

Je voudrais également remercier tous les autres membres de l'équipe, **Guillaume Audic**, **Sacnicite Ramirez Rios**, **José Martinez Hernandez**, **Laeticia Peris** et **Jean-Marc Soleilhac** pour avoir participé à l'ambiance chaleureuse et accueillante de l'équipe. Merci également à **Yves Goldberg** pour les nombreux conseils statistiques et à **Marie-Jo Moutin** pour m'avoir permis de collaborer sur l'un de vos projets. Un grand merci à notre gestionnaire **Sylvain Andrieux**, pour avoir géré toutes les urgences de commandes et les missions de voyage.

Je voudrais ensuite remercier les thésards de l'équipe, **Quentin** (ou docteur car tu y tiens et tu ne l'auras pas volé), **Apolline** et **Maxime**. Par où commencer ?? Vous êtes des personnes incroyables et vous avez fait de ces années de thèse une expérience inoubliable. Merci pour les sorties en tous genres, saut à l'élastique, matchs de squash, les soirées jeux et autres divertissements. **Quentiiiiiiiiinnnn**, merci pour les randos, les découvertes culinaires et les sorties running. **Apolline**, ma douce, merci pour avoir partagé avec moi la salle d'électrophysio et tous les moments de frustration (oh, et ils étaient nombreux) comme de joie. **Maxime**, je ne comprendrai jamais tous les messages que tu m'écris car l'écart de génération ce fait ressentir mais le tricératops te remercie également. J'espère que l'on se reverra rapidement avant que Quenquen monte notre start up !! Un énorme merci pour tous les fous rires et les merveilleux moments passés avec vous. Votre soutien a été inestimable surtout à l'approche de la fin, vous allez beaucoup me manquer. Force à vous pour la fin de votre thèse. Ne changez rien !! **Apolline**, le gourou du patch sera toujours joignable au cas où.

En dehors de l'équipe, un immense merci à **Laeticia**, **Romane** et **Émeline**. Vous étiez à mes côtés dès le début de cette thèse, et vous m'avez aidé à la mener à

bien. Merci pour nos sorties, nos moments en poste de secours et pour vos conseils. Je vous souhaite le meilleur pour la suite, tant personnellement que professionnellement.

À mes proches, **Raphaël, Charlène, Adryan et Noémie**, un grand merci pour votre soutien tout au long de cette aventure. Que ce soit dans les moments d'accalmie ou dans les périodes plus difficiles, j'ai toujours pu compter sur vous pour retrouver le sourire et me remotiver. Merci d'avoir été présents et d'avoir rendu cette période plus légère. **Noémie**, détective, j'espère bientôt pouvoir assister à ta soutenance à Berlin.

Enfin mes derniers remerciements s'adressent à ma famille qui a été présente à chaque étape de mon parcours. **Papa et maman**, merci pour avoir toujours cru en moi et fait votre possible pour me soutenir sans relâche, depuis le début, dans tous les projets que j'ai entrepris. Votre soutien indéfectible et votre réconfort ont été ma plus grande force durant ces années et j'ai énormément de chance de vous avoir à mes côtés. J'espère que ce manuscrit, ainsi que le travail accompli seront à la hauteur des valeurs que vous m'avez transmises. À mes frères et sœur, **Nicolas, Dorian et Naomie**, un immense merci pour vos rires, votre amour et vos encouragements. Les moments passés ensemble ont été de véritables bouffées d'oxygène tout au long de cette thèse, et je n'aurais jamais pu accomplir ce chemin sans vous.

Table des matières

Abréviations	5
Introduction	7
Première partie : La maladie d'Alzheimer	7
A. Généralités	7
1) Historique	7
2) Statistique et enjeux sociétaux	8
B. Formes familiales et sporadiques de la maladie d'Alzheimer	9
1) Les formes familiales	9
2) Les formes sporadiques	10
C. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer	15
1) Symptômes	15
2) Les stades de progression	16
3) Diagnostique	18
D. Stade préclinique et biomarqueurs	19
1) Évolution des biomarqueurs protéiques	21
2) Perte synaptique et réduction de la connectivité	22
3) Hyperactivité neuronale	24
E. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	26
1) Les caractéristiques neuropathologiques	26
2) La pathologie amyloïde	28
E. Modèles animaux	32
F. Stratégies thérapeutiques	36
1) L'immunothérapie	37
2) Régulation de l'hyperactivité hippocampique	38
Deuxième partie : La neurotransmission dans l'hippocampe	40
A. Fonctionnement de l'hippocampe	40
1) Structure anatomique et circuits hippocampiques	41
2) Implication de l'hippocampe dans la mémoire	49
B. La neurotransmission hippocampique	51

1) Transmission synaptique et équilibre ionique.....	51
2) La transmission excitatrice et la plasticité synaptique.....	54
3) La transmission inhibitrice.....	59
4) La balance excitation/inhibition et homéostasie du Cl ⁻	62
C. Le co-transporteur KCC2.....	64
1) Structure du KCC2 et profil d'expression.....	64
2) Fonctions du KCC2	67
3) Régulation du KCC2.....	70
D. Neurotransmission Hippocampique et Pathologie d'Alzheimer : Rôle du peptide A β	81
1) Effet hormétique du peptide A β	81
2) A β et synaptotoxicité	83
Objectifs	91
Matériel et Méthodes	93
A. Animaux.....	93
B. Mesures électrophysiologiques de l'activité neuronale	94
1) Préparation des tranches aigües d'hippocampe	94
2) Préparation des oligomères d'A β humains.....	94
3) Enregistrements extracellulaires et mesures de la plasticité neuronale.....	95
4) Enregistrement patch-clamp en configuration cellule entière	96
C. Analyses biochimiques et Imagerie cellulaire	99
1) Western Blot	99
2) Co-immunoprécipitation	101
3) Culture primaire de neurones hippocampiques.....	101
4) Fractionnement cellulaire	102
5) Immunomarquage des neurones hippocampiques	102
6) Imagerie confocal sur cellules fixées	103
D. Injections intrapéritonéales.....	104
E. Analyses statistiques	104
Résultats	105
I. Altération de la neurotransmission hippocampique, l'un des premiers événements physiopathologiques induit par l'amyloïde- β	105
A. Altération de l'équilibre E/I médiée par les oligomères β -amyloïdes.....	105

B. Implication de l'APP et de son clivage dans les perturbations de la neurotransmission provoquées par l'A β o.....	108
C. Clivage de l'APP et réduction de l'expression des co-transporteurs KCC2, un mécanisme à l'origine des dérégulations induites par l'A β o	111
II. Altération de la neurotransmission hippocampique chez les souris APP/PS1-21, modèle précoce de la maladie d'Alzheimer.....	118
A. Modification de l'équilibre E/I chez les souris APP/PS1-21 âgées d'un mois	118
B. Réduction de l'activité GABAergique et facilitation des processus de plasticité chez les souris APP/PS1-21	120
III. Rétablissement de la balance E/I après restauration pharmacologique de la fonction et de l'expression des KCC2.....	124
Discussion.....	129
I Perturbation de l'équilibre E/I et les protéines impliquées	130
A. Altération de la transmission inhibitrice et APP.....	130
B. Interaction APP/KCC2, acteur central des perturbations GABAergiques .	134
II Conséquence d'un déséquilibre E/I chez les souris APP/PS1-21	136
III Restauration pharmacologique du KCC2.....	137
IV Les astrocytes, autres acteurs essentiels dans la régulation de la neurotransmission	138
Conclusion générale.....	140
Annexes	141
Références.....	143

Abréviations

A β : Peptide β -amyloïde

A β o: Oligomères d'A β

ACSF: *Artificial cerebrospinal fluid*

AICD : Domaine intracellulaire de l'APP

AMPA : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoazolepropionique

APOE : Apolipoprotéine E

APP : *Amyloid precursor protein*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

CA : *Cornu Ammonis*

CCCs : *Cation chloride cotransporter*

DG : Gyrus denté

DNF : Dégénérescences neurofibrillaires

E_{GABA} : Potentiel d'équilibre des récepteurs GABA_A

eIPSC : *Evoqued inhibitory post-synaptic current*

fEPSP : *Field excitatory post-synaptic potential*

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GABAR : Récepteur au GABA

GluR : Récepteur au glutamate

HFS : *High frequency stimulation*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

KCCs : Co-transporteur K⁺/Cl

KI: *Knock-in*

KO : *Knock-out*

LCR: Liquide céphalo-rachidien

LTD : *Long term depression*

LTP : *Long term potentiation*

MA : Maladie d'Alzheimer

MCI : *Mild cognitive impairments*

MEG : Magnétoencéphalographies

MMSE : *Mini-Mental State Examination*

NKCCs : Co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}$,

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PSEN1: Présiniline 1

PSEN2: Présiniline 2

sEPSC : *Spontaneous excitatory post-synaptic current*

sIPSC: *Spontaneous inhibitory post-synaptic current*

SNC : Système nerveux central

tau : *Tubulin-associated unit*

TBS : *Theta burst stimulation*

TEP : Tomographie par émission de Positrons

TTX : Tétrodoxtine

WT : *Wild type*

Introduction

Première partie : La maladie d'Alzheimer

A. Généralités

1) Historique

C'est en 1907 que la maladie d'Alzheimer a été diagnostiquée pour la première fois par le psychiatre et neuropathologie allemand Alois Alzheimer (1864-1915), qui lui donnera son nom. Six ans auparavant, le Dr. Alzheimer avait entendu parler d'une patiente, alors âgée de 51 ans, prénommée Auguste Deter (Figure 1). Celle-ci présente de nombreuses difficultés cognitives telles que des troubles de la mémoire avec une difficulté à se rappeler des événements récents, un mutisme, une désorientation et enfin des hallucinations. Il décide donc de prendre en charge cette patiente afin d'évaluer l'évolution de ces symptômes. A la suite de son décès, le Dr. Alzheimer demande à autopsier le cerveau d'Auguste Deter. Il constate alors une diminution de certaines zones cérébrales associée à la présence de dépôts anormaux, qui seront plus tard qualifiés de

plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Ces éléments constitueront la signature histologique de la maladie d'Alzheimer. D'autres scientifiques, tels que le psychiatre et neuropathologiste tchèque Oskar Fischer ainsi que le médecin italien Gaetano Perusini, collaborateur du Dr. Alzheimer, ont également contribué activement à la découverte de cette maladie.

Dès lors, les recherches sur cette pathologie n'ont cessé de susciter un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique, renforcé par le développement des

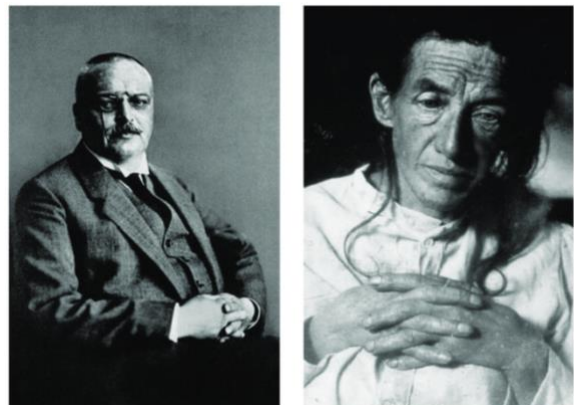


Figure 1: Portrait du Dr Alois Alzheimer (gauche) et d'Auguste Deter (droite)

Dès lors, les recherches sur cette pathologie n'ont cessé de susciter un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique, renforcé par le développement des

outils d'observation microscopique et l'utilisation de nouvelles colorations histologiques.

2) Statistique et enjeux sociétaux

Aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer compte parmi les maladies neurodégénératives les plus connues et étudiées dans le domaine des neurosciences.

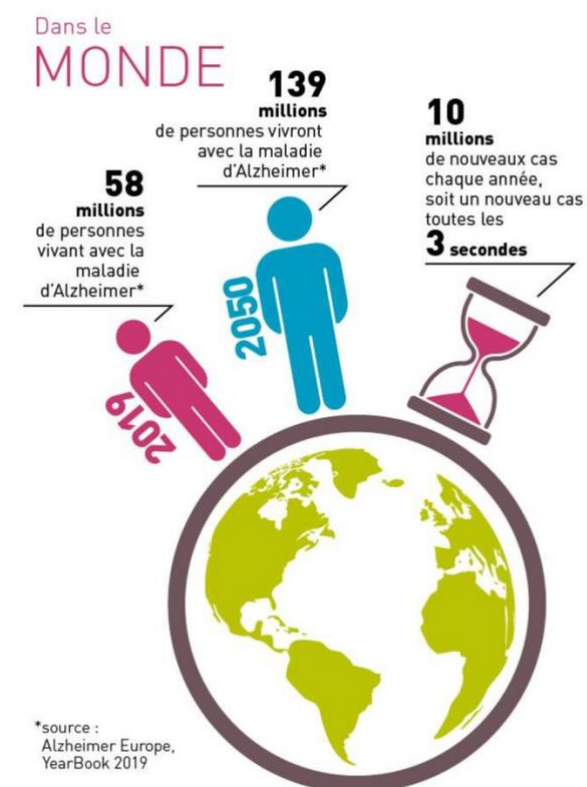


Figure 2 : Projection du nombre de personne atteinte par la maladie d'Alzheimer dans le monde en 2050 d'après Alzheimer Europe, YearBook 2019

Représentant la 4^{ème} cause de mortalité en France, sa prise en charge constitue un enjeu de santé majeur. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, son incidence est appelée à croître dans les prochaines années. En effet, les prévisions d'Alzheimer Europe estiment que le nombre de personnes atteintes par cette maladie doublera d'ici 2050.

D'un point de vue économique, les répercussions de cette maladie sont lourdes pour la société avec un coût annuel global évalué à 32 milliards d'euros, dont 5.3

En cause, son incidence extrêmement élevée qui fait de cette pathologie la première cause de démence au niveau mondial. En effet, plus de 80 millions de personnes étaient atteintes de démence en 2019 et la maladie d'Alzheimer représentait, à elle seule, 70% des cas (Figure 2) (Organisation mondiale de la santé 2019). Au niveau national, on estime qu'une personne sur cinq développera la maladie d'Alzheimer après 75 ans, et la France compte à ce jour environ 1.2 million de patients diagnostiqués selon les chiffres de la fondation pour la recherche Médicale. Selon cette même source, le nombre de nouveau cas est estimé à 225 000 chaque année.

milliards pour les coûts médicaux et paramédicaux du secteur sanitaire et 3.7 milliards pour les soins du secteur médico-social (Haut conseil de santé publique 2017).

Enfin, parmi les personnes touchées par cette maladie, il est important de considérer les aidants et l'impact du diagnostic sur leur vie quotidienne. Aujourd'hui, il y a environ 4,3 millions d'aidants en France (France Alzheimer, 2019). La plupart d'entre eux sont des membres de la famille des patients et jouent un rôle essentiel dans l'accompagnement, la prévention, la coordination des soins et le maintien à domicile des patients. Ils constituent une source importante de motivation et d'aide pour les patients et influencent considérablement leur évolution. Devenir aidant nécessite néanmoins d'opérer des changements considérables dans son quotidien et son travail. Des soutiens matériels, financiers et psychologiques, ainsi que des formations concernant la prise en charge, sont alors nécessaires, ajoutant un coût supplémentaire estimé à plus de 14 milliards d'euros (Haut Conseil de la Santé Publique, 2017). L'ensemble de ces chiffres témoigne de l'importance des recherches menées sur la maladie d'Alzheimer, dont les enjeux sociétaux et économiques sont conséquents et devraient s'accroître dans les prochaines années.

B. Formes familiales et sporadiques de la maladie d'Alzheimer

1) Les formes familiales

On distingue deux formes de la maladie d'Alzheimer. La première, dite familiale, représente moins de 1% des cas. Cette forme très rare et particulièrement sévère, d'origine génétique, provoque une apparition plus précoce de la maladie. Aussi appelée forme autosomique dominante, elle se caractérise par des mutations héréditaires situées au niveau de trois gènes codants pour les protéines *Amyloid Precursor Protein* (APP), préséniline 1 (PSE1) et préséniline 2 (PSE2). Il est intéressant de noter que ces mutations, découvertes dans les années 1990, sont toutes impliquées dans l'augmentation de la production et l'agrégation du peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) (Goate, 2006). Chez l'Homme, les gènes PS1 et PSE2 sont localisés au niveau des chromosomes 1 et 14 respectivement. Le gène de l'APP est quant à lui

situé au niveau du chromosome 21. Cette localisation particulière est à l'origine d'une augmentation significative de la prévalence ainsi que d'une apparition en moyenne plus précoce de la maladie d'Alzheimer (environ 55 ans) chez les personnes atteintes de trisomie 21, également appelée syndrome de Down (Hartley *et al.*, 2015; Castro, Zaman and Holland, 2017). C'est aujourd'hui la première cause de mortalité dans cette population (Fondation vaincre Alzheimer).

Si l'on considère seulement le gène de l'APP, une trentaine de mutations pathologiques ont été caractérisées. Ces mutations apparaissent le plus souvent à proximité des sites de clivage de l'APP. Parmi les plus étudiées, on peut citer la mutation « Swedish » (K595N/M596L), une double mutation adjacente au site de clivage de l'APP par la β -sécrétase (Zhou *et al.*, 2022). On peut aussi citer la mutation « Osaka » qui se traduit par une délétion du codon 693 du gène APP, produisant un mutant A β dont les capacités d'oligomérisation sont accélérées (Tomiyama and Shimada, 2020). L'ensemble de ces mutations a conduit à l'hypothèse de la cascade amyloïde, selon laquelle la présence du peptide A β seul serait suffisante pour initier une cascade moléculaire toxique conduisant à la neurodégénérescence puis aux manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer.

Si la majorité des mutations génétiques héréditaires précédemment évoquées sont pathologiques, certaines mutations n'entraînent pas nécessairement une apparition précoce de la maladie. De façon surprenante, certaines semblent même protéger et retarder le développement de la pathologie. En effet, les travaux de Jonsson *et al.* (2012) ont permis de caractériser la mutation A673T nommée « Icelandic » qui pourrait protéger les porteurs contre le déclin cognitif (Jonsson *et al.*, 2012). Plus précisément, cette étude réalisée chez 1795 islandais a montré que cette unique mutation par substitution, située près du site de clivage de l'APP par la β -sécrétase, est à elle seule capable d'entraîner une réduction d'environ 40 % de la production du peptide β - amyloïde in vitro (Proft and Weiss, 2012).

2) Les formes sporadiques

Les formes sporadiques, ou non-familiales de la maladie d'Alzheimer, sont les plus courantes, représentant plus de 99% des cas. Ces formes résultent d'un ensemble complexe de facteurs génétiques, environnementaux et liés à notre mode

de vie. Bien que ces facteurs augmentent significativement le risque de développer la maladie, ils ne sont pas des causes directes. Étant une maladie du vieillissement, le premier facteur de risque, et le plus évident, est l'âge avec une prévalence qui double tous les 5 ans à partir de 65 ans (A. Armstrong, 2019).

a) Facteurs de risque génétiques

Les facteurs de risque principaux, après l'âge, sont les facteurs génétiques qui représentent entre 60 à 80% des risques (Gatz *et al.*, 2006). En effet, plus d'une dizaine de gènes ont été identifiés comme favorisant l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Parmi eux, le gène codant pour la protéine Apolipoprotéine E (ApoE) est particulièrement important, apparaissant comme le facteur de risque génétique majeur. Ce gène, situé sur le chromosome 19 chez l'Homme, présente trois variations alléliques ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$). L'allèle $\epsilon 3$ est le plus courant, représentant 77 % des allèles, contre seulement 8 % pour $\epsilon 2$ (Strittmatter *et al.*, 1993).

Dans le cerveau, les astrocytes sont les principaux responsables de la production de l'ApoE. Cependant, il a été montré que les neurones corticaux et hippocampiques pouvant également exprimer l'ApoE en réponse à des lésions excitotoxiques (Huang and Mahley, 2014). Des analyses histologiques menées sur des cerveaux Alzheimer humains par Namba *et al.* (1991) ont révélé que l'ApoE pouvait se lier directement avec l'A β . Cette interaction accélérerait l'oligomérisation du peptide A β et favoriserait sa stabilisation en diminuant sa clairance, de manière dépendante de l'isoforme (apoE4 > apoE3 > apoE2) (Namba *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 2012; Castellano *et al.*, 2012). Ainsi, l'expression de l'isoforme $\epsilon 4$ seule augmenterait de 2.6 fois le risque de développer la pathologie et ce risque augmenterait de près de 15 fois en cas d'une homozygotie (Farrer, 1997). À l'inverse, l'expression de la forme $\epsilon 2$ semblerait être neuroprotectrice et permettrait de diminuer la production du peptide A β de par ses fonctions neurotrophiques mais aussi antioxydantes (Castellano *et al.*, 2012; Brookhouser *et al.*, 2021). Les mécanismes conférant à l'allèle $\epsilon 2$ ces qualités neuroprotectrices restent cependant encore incompris. Depuis la découverte du lien entre l'ApoE et la maladie d'Alzheimer, d'autres gènes ont été identifiés comme favorisant l'avancement de la maladie. Une

méta-analyse parue en 2022, regroupant 20 464 de malades Alzheimer diagnostiqués cliniquement et 22 244 témoins, a notamment révélé que les gènes comme Bin1 et PICALM, tous deux impliqués dans les mécanismes d'endocytose, comptent parmi les plus significatifs (Figure 3).

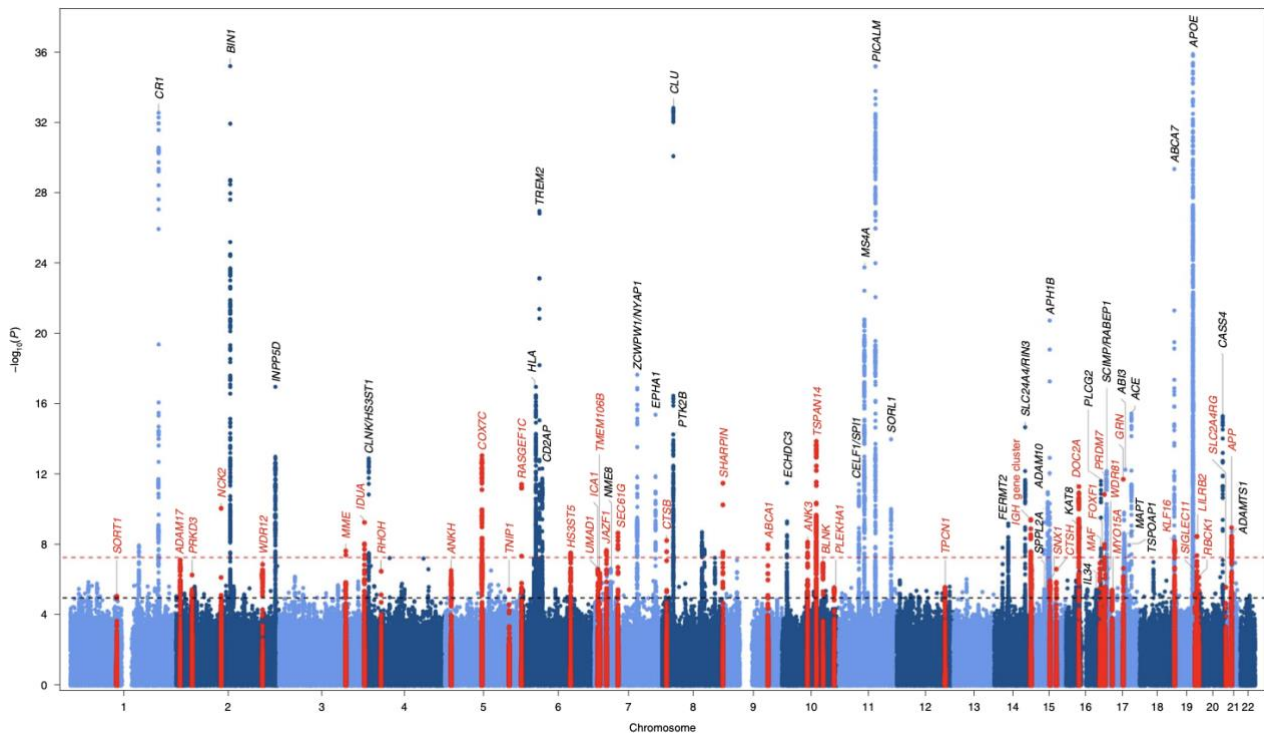


Figure 3 : Manhattan plot de l'association pangénomique travaillant sur la maladie d'Alzheimer (20 464 cas de MA diagnostiqués cliniquement et 22 244 témoins ont été rassemblés dans 15 pays européens) (Bellenguez *et al.*, 2022). Les loci présentant un signal significatif à l'échelle du génome sont annotés (loci connus en noir et nouveaux loci en rouge). La ligne pointillée rouge représente le niveau de signification à l'échelle du génome ($p = 5 \cdot 10^{-8}$) et la ligne pointillée noire représente le niveau de signification suggestif ($p = 1 \cdot 10^{-5}$).

b) Facteurs de risque environnementaux

Il est aujourd'hui reconnu que certains facteurs environnementaux favorisent l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Contrairement aux facteurs génétiques, les facteurs environnementaux peuvent être modifiables. En l'absence de traitement efficace à ce jour, la connaissance de ces derniers, qui sont nombreux, permet d'adopter des comportements préventifs susceptibles de réduire considérablement le risque de développer la maladie. Par conséquent, les recherches visant à identifier ces facteurs de risque constituent un enjeu de santé publique.

La première catégorie de facteurs environnement influençant l'émergence de la maladie sont les facteurs de risque cardiovasculaires. Le principal d'entre eux est l'hypertension. L'hypertension est actuellement définie comme une pression artérielle systolique (PAS) supérieure à 140 mm Hg et/ou une pression diastolique (DBP) supérieure à 90 mm Hg. On estime que l'hypertension affecte 25 % de la population générale, avec une prévalence de 50 % chez les personnes âgées de plus de 70 ans (Dickstein *et al.*, 2010). L'utilisation de traitements antihypertenseurs semblerait réduire l'incidence du déclin cognitif chez les personnes âgées. Cet effet protecteur des médicaments antihypertenseurs, rapporté par l'étude de *KUNGS HOLMEN*, serait d'autant plus marqué chez les porteurs de l'allèle apoE4 mentionné précédemment (Guo *et al.*, 2001; Skoog and Gustafson, 2006).

Un autre facteur de risque avéré est le diabète, en particulier le diabète de type 2. En effet, plusieurs études ont souligné l'impact de l'altération du métabolisme du glucose sur l'apparition et la progression de la maladie d'Alzheimer, au point que certains le considère même comme le « diabète de type 3 ». Cette association pourrait être expliquée par l'implication du glucose dans certaines modifications post-traductionnelles ou encore par son rôle dans le phénomène de désensibilisation à l'insuline (Lebovitz and Banerji, 2004; Jayaraj, Azimullah and Beiram, 2020; González *et al.*, 2022). De plus, l'altération de l'action de l'insuline dans le cerveau semble aussi contribuer à l'accumulation d'A β (Alford *et al.*, 2018). Ce phénomène est largement observé chez les personnes souffrant d'obésité, constituant elle-même un autre facteur de risque dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Flores-Cordero *et al.*, 2022).

Enfin, l'hygiène de vie occuperait une place centrale parmi les facteurs de risque. Notre alimentation et la consommation de certaines substances telles que le tabac et l'alcool peuvent également favoriser le développement de la maladie (Graves *et al.*, 1991; Cataldo, Prochaska and Glantz, 2010; Piazza-Gardner, Gaffud and Barry, 2013). Les effets peuvent être directes, comme pour les benzodiazépines,

médicaments largement prescrits en raison de leurs propriétés anxiolytiques, hypnotiques et myorelaxantes.

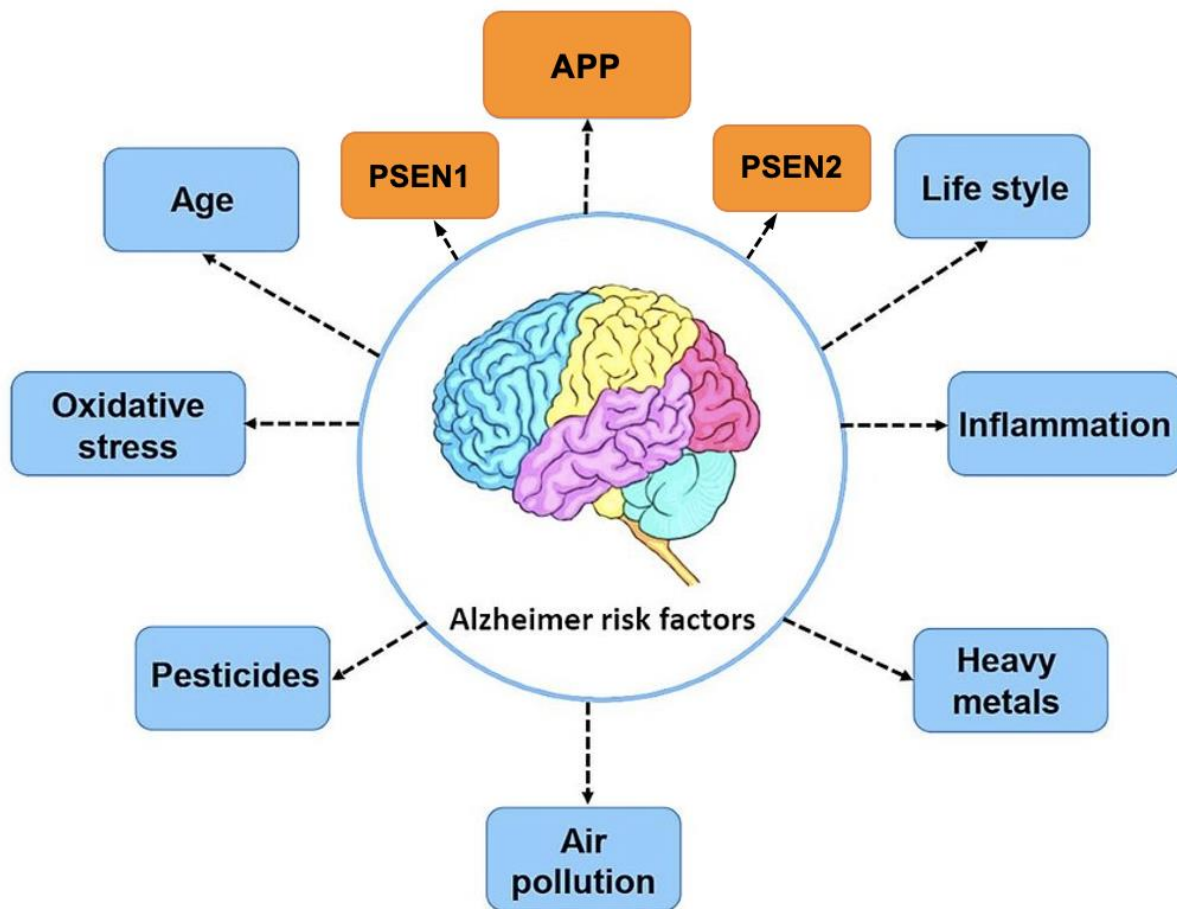


Figure 4 : Principaux facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer (adaptée de Sahebkar *et al.*, 2021) Les facteurs génétiques (orange) et environnementaux (bleu) illustrés dans cette figure sont les plus courants.

Ces médicaments sont connus pour entraîner une diminution du *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) qui module la transmission synaptique et affecte l'expression du gène APP (Jovanovic *et al.*, 2004; Etcheto *et al.*, 2020). L'exposition à certains métaux tels que le plomb ou le mercure (Chin-Chan *et al.*, 2015), la consommation de tabac et d'alcool, ainsi qu'une alimentation déséquilibrée couplée à un mode de vie sédentaire pourraient, quant à eux, avoir un effet indirecte, en contribuant à l'apparition de l'obésité, du diabète et de l'hypertension. En revanche, une bonne hygiène de vie associée à la pratique d'une activité physique régulière et la préservation d'activités sociales et intellectuelles, pourrait aider à retarder l'apparition de la maladie (Sattler *et al.*, 2012; Santos-Lozano *et al.*, 2016). Cette liste, bien que non exhaustive, des différents facteurs de risque, qu'ils soient génétiques ou

environnementaux (Figure 4), souligne la complexité et la diversité des éléments pouvant favoriser l'apparition de la maladie d'Alzheimer, ajoutant ainsi un niveau de complexité à sa compréhension.

C. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer

1) Symptômes

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative le plus souvent associée à une perte de la mémoire. Bien que la perte de mémoire constitue l'un des premiers signes de la maladie, une pléiade d'autres symptômes peuvent également se manifester, et leur évolution peut varier en fonction des individus. On relate ainsi une dizaine de signes qui, s'ils sont récurrents et perçus par le patient et/ou son entourage, doivent inciter à la prise de rendez-vous médicale en vue d'un diagnostic. Les symptômes les plus communs sont les suivants :

- Les troubles de la mémoire : c'est dans un premier temps la mémoire à court terme qui est affectée, puis, la progression de la maladie altère la mémoire à long terme.
- Les troubles du langage : la personne a des difficultés à trouver ses mots ou employer les termes appropriés.
- La difficulté à accomplir des tâches de la vie quotidienne telles que la préparation des repas, s'habiller, ou encore conduire.
- La perte de motivation.
- La désorientation dans le temps et l'espace : la personne peut se perdre dans un endroit qui lui est pourtant familier.
- La perte d'objet.
- La difficulté de raisonnement : la personne doit être assistée pour des tâches administratives comme payer ses factures.
- Les changements d'humeur et de personnalité.
- L'incapacité de reconnaître des personnes ou des objets familiers.

Ces signes témoignent de la dégradation des fonctions cognitives et impactent profondément la qualité de vie des patients et de leur entourage. À mesure que la

maladie progresse, ces symptômes s'aggravent, entraînant une perte totale d'autonomie pour les patients. Les difficultés croissantes peuvent rendre les tâches quotidiennes impossibles à accomplir sans assistance, ce qui conduit souvent à la nécessité d'une prise en charge dans des structures médicales spécialisées.

2) Les stades de progression

Si l'on s'intéresse au décours de la pathologie, trois stades de démence ont été décrits et permettent d'appréhender son avancement (Figure 5). Chaque stade est alors déterminé en évaluant l'étendue des symptômes cognitifs (avec le score MMSE pour *Mini Mental Status Examination*), comportementaux et neurologiques qui lui sont spécifiques (López and DeKosky, 2008; Bellenguez *et al.*, 2022) :

- Le stade asymptomatique

Ce premier stade asymptomatique peut perdurer plus d'une dizaine années. Les symptômes cliniques sont alors imperceptibles et n'ont pas encore d'incidence sur la vie des patients. En revanche, les perturbations au niveau cérébral ont déjà commencé.

- Le stade prodromal

Aussi appelé MCI pour *Mild Cognitive Impairment* ou déficit cognitif léger en français, ce stade peut persister jusqu' 5 ans. Les symptômes, dont la sévérité peut être très variable d'un individu à l'autre, peuvent rester très légers sans pour autant affecter le quotidien des personnes. En conséquence, ce stade peut être difficile à détecter. Les patients peuvent toutefois présenter des troubles de la mémoire tels que l'oubli de faits récents, ainsi que des difficultés à accomplir les tâches quotidiennes. À ce stade, les patients peuvent être en mesure de détecter ses changements pour en rendre compte à leur entourage et/ou organiser les soins.

- Le stade de démence

Considérée comme syndrome chronique ou évolutif, la démence désigne une grave détérioration des fonctions cognitives et la perte progressive de l'autonomie. On distingue trois phases de démence : la démence légère, modérée et sévère.

La démence légère se caractérise par des troubles affectant la plupart des fonctions cognitives. Les patients peuvent également avoir des difficultés à reconnaître leur entourage et présenter les premiers signes de changement d'humeur et de dépendance, nécessitant parfois un accompagnement pour certaines tâches quotidiennes. Ce stade est donc décisif pour les aidants qui seront davantage impliqués dans le parcours de soin.

Au stade modéré de la démence, les personnes ont davantage de difficulté à accomplir des tâches multiples comme s'habiller ou se laver. L'apathie et les changements d'humeur sont exacerbés.

Enfin, au stade le plus avancé et sévère de la démence, la capacité des patients à communiquer est gravement affectée. En raison des atteintes cérébrales, notamment au niveau des régions responsables du mouvement, une assistance et des soins réguliers sont désormais nécessaires.

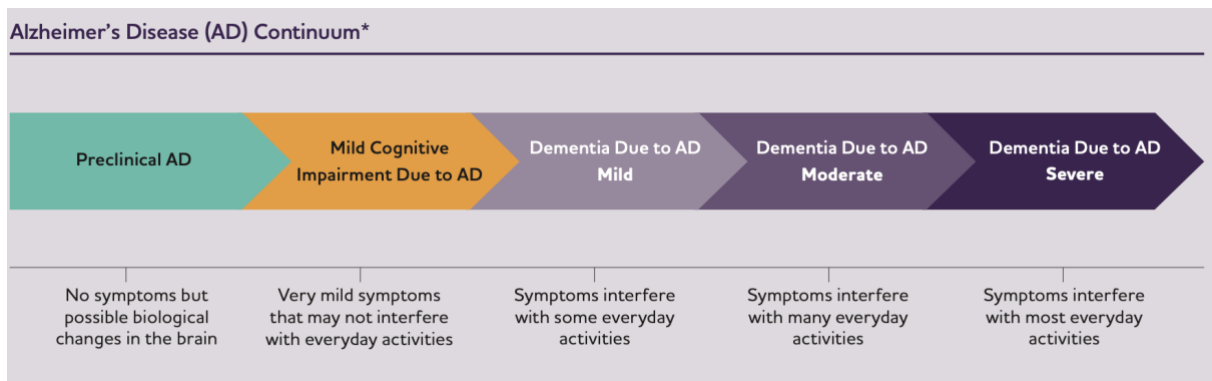


Figure 5: Évolution des stades cliniques de la maladie d'Alzheimer (Alzheimer's Association 2024 Alzheimer's Disease Facts and Figures). Sur cette figure apparaissent les différents stades de la maladie d'Alzheimer et les symptômes associés. Le stade asymptomatique « Preclinical Alzheimer's disease (AD) » précède le stade MCI et enfin les stades de démence légère (mild), modérée (moderate) et sévère (severe).

3) Diagnostique

L'une des principales difficultés de la maladie d'Alzheimer est d'établir son diagnostic le plus rapidement possible afin de pouvoir mettre en place un traitement susceptible d'atténuer les symptômes cognitifs. Actuellement, le diagnostic repose sur la mesure de deux paramètres principaux. Le premier est l'évaluation des symptômes cognitifs à l'aide d'un panel de tests neuropsychologiques. Le deuxième est l'évolution de deux biomarqueurs, le peptide A β ₄₂ et la protéine Tau. Ces biomarqueurs sont associés aux deux lésions caractéristiques de la maladie, à savoir les plaques amyloïdes, également appelées plaques séniles, et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs). Bien que ces deux biomarqueurs soient cruciaux, la contribution de la protéine Tau à la maladie d'Alzheimer sera abordée de manière limitée dans ce manuscrit, car elle n'a pas été étudiée durant ma thèse.

Parmi les tests neuropsychologiques utilisés, on retrouve le test MMSE, précédemment évoqué. Ce test d'une quinzaine de minutes consiste en une série de 30 questions permettant d'évaluer l'orientation spatio-temporelle, l'apprentissage, le calcul, la transcription d'information, le langage et la praxie. À l'issue de ce test, un score est calculé et permet d'établir le stade de progression de la maladie (López and DeKosky, 2008). D'autres tests, évaluant les mêmes paramètres, sont aussi couramment utilisés tels que le test bien connu de l'horloge (Figure 6) (Sunderland *et al.*, 1989).

Outre l'évaluation des aptitudes cognitives des patients, l'imagerie cérébrale est aussi utilisée pour préciser ou confirmer les résultats des test neuropsychologiques. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'une des méthodes les plus utilisées actuellement. Cette technique non invasive, dont la sensibilité n'a cessé de s'améliorer, permet de suivre le niveau d'atrophie cérébrale et ainsi de prédire avec précision le stade d'avancement de la maladie (Kehoe *et al.*, 2014; DeTure and Dickson, 2019). L'imagerie par tomographie par émission de positron (TEP) est également largement employée. Cette technique d'imagerie nucléaire nécessite l'injection d'un produit radioactif ou traceur, qui permet de suivre le métabolisme des cellules (Coleman, 2007).

Si l'un des traceurs les plus couramment utilisé est le fluorodéoxyglucose (FDG), qui permet de suivre la consommation de glucose cérébral, la TEP a également bénéficié d'améliorations importantes permettant désormais de suivre avec exactitude les dépôts amyloïdes et tauopathiques caractéristiques de la pathologie Alzheimer. On parle désormais de TEP-amyloïde ou de TEP-tau, en référence aux analyses utilisant les traceurs permettant de visualiser les plaques amyloïdes ou la protéine Tau, à savoir le composé B de Pittsburgh et le ^{18}F -flortaucipir, respectivement (Martínez *et al.*, 2017; Tanner *et al.*, 2022).

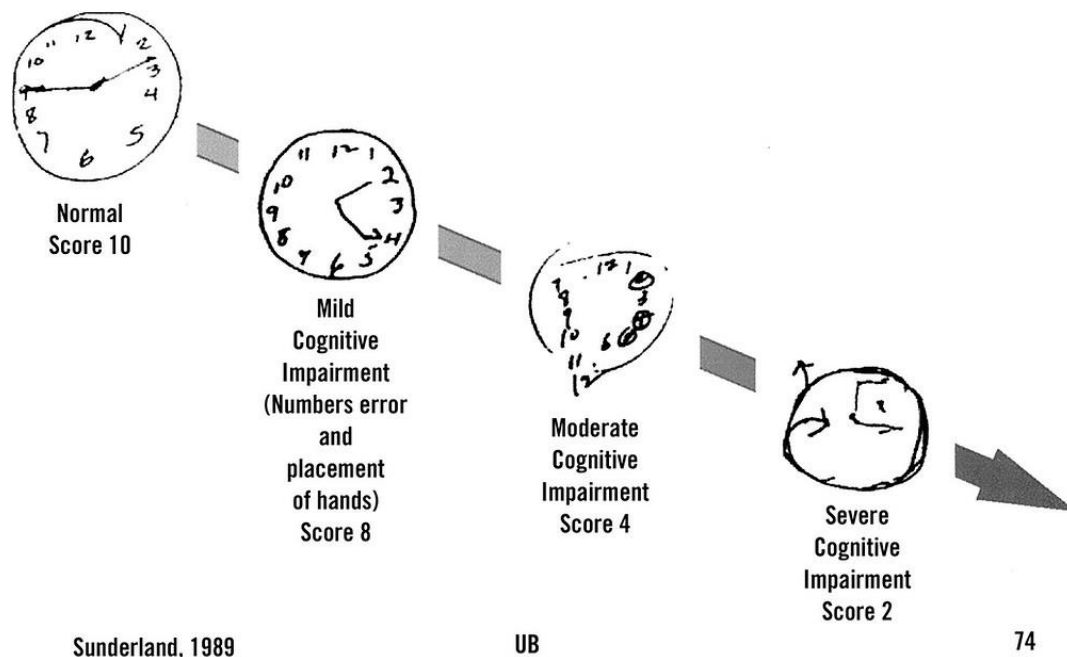


Figure 6: Test de l'horloge de (adaptée de Sunderland *et al.* 1989). Cette figure illustre la façon dont est représentée l'horloge au cours du test de Sunderland visant à évaluer le stade de progression de la maladie d'Alzheimer ainsi que le score attribué aux différents dessins.

Enfin, la technique de diagnostic privilégiée en France est la ponction lombaire qui permet de détecter et suivre l'évolution du peptide $\text{A}\beta_{42}$ ainsi que de la protéine Tau dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Rosenmann, 2012).

D. Stade préclinique et biomarqueurs

Au cours des dernière décennies, les recherches menées sur la maladie d'Alzheimer ont bouleversé notre compréhension de la pathologie ainsi que les stratégies thérapeutiques associées, lesquelles seront évoquées dans un prochain

chapitre. On a longtemps considéré que la présence de lésions cérébrales, notamment les plaques amyloïdes, constituaient l'élément central à l'origine des troubles cognitifs. Les stratégies thérapeutiques alors proposées avaient pour but de diminuer ces lésions. Cependant, l'observation de ces plaques chez des individus ne présentant aucun problème cognitif a remis cette hypothèse en question (Dickson *et al.*, 1992). En outre, chez les patients atteints d'Alzheimer, l'apparition de ces plaques intervient le plus souvent lorsque les troubles cognitifs sont déjà perceptibles et irréversibles. Il est alors devenu évident que, pour être pleinement efficace, le traitement devait être administré le plus tôt possible, avant même l'apparition des premiers symptômes. Par conséquent, la détection du stade préclinique de la maladie d'Alzheimer est devenue l'un des enjeux majeurs des recherches actuelles.

Pour harmoniser et préciser les critères diagnostiques du stade préclinique, l'objectif principal réside désormais dans l'identification de biomarqueurs spécifiques de cette phase asymptomatique. Ce défi est complexe puisqu'aucun symptôme ne permet la détection de ce stade chez les patients. En conséquence, les biomarqueurs utilisés pour les phases précliniques proviennent principalement de recherches menées chez des patients au stade prodromal ou MCI, et ne permettent pas encore d'établir le diagnostic de façon définitif. En effet, le stade MCI se caractérise par des performances cognitives inférieures à celles attendues pour des personnes de leur âge. Cependant, si certains patients MCI évoluent vers le stade de démence (relative ou non à la MA), d'autres ne présentent aucune progression des symptômes et ne développent pas de démence. Certains voient même leur état s'améliorer (Drago *et al.*, 2011).

Néanmoins, l'évaluation de la progression des symptômes et la confirmation *post-mortem* du diagnostic permettent la réalisation d'études rétrospectives. Ces études ont permis divers biomarqueurs classés selon trois catégories : les biomarqueurs protéiques, les atteintes de la morphologie et de la connectivité cérébrale et enfin les marqueurs d'activité neuronale.

1) Évolution des biomarqueurs protéiques

Dans cette première catégorie de biomarqueurs sont regroupés les protéines directement quantifiables dans le plasma ou le LCR et dont l'évolution permet de prédire l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Parmi ces biomarqueurs, on peut tout d'abord citer la réduction notable du peptide $A\beta_{42}$ dans le plasma.

Une étude réalisée sur 62 patients atteints de troubles cognitifs légers (MCI), dont 43%

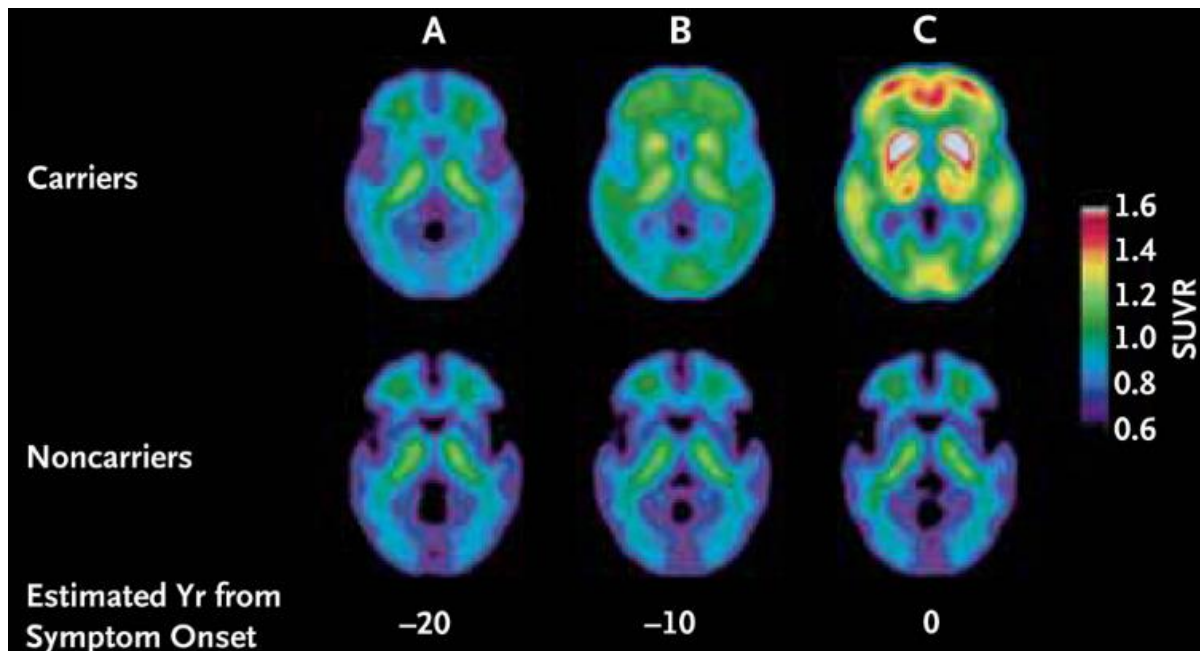


Figure 7. Dépôt $A\beta$ dans la maladie d'Alzheimer autosomique dominante des années avant l'apparition prévue des symptômes cliniques (Bateman *et al.*, 2012). Le panneau compare les dépôts fibrillaires d' $A\beta$, mesurés par TEP à l'aide du composé B de Pittsburgh (PIB) chez des porteurs et des non-porteurs de mutations autosomiques dominantes de la maladie d'Alzheimer, 20 ans (panneau A), 10 ans (panneau B) avant la date estimée d'apparition des symptômes. Le panneau C montre des dépôts supplémentaires d' $A\beta$ au moment estimé de l'apparition des symptômes.

ont été ultérieurement diagnostiqués avec la maladie d'Alzheimer, a révélé une diminution du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, associée à une augmentation de 70% du risque de progression du stade MCI vers la maladie d'Alzheimer (Pérez-Grijalba *et al.*, 2018). Cette réduction du peptide $A\beta_{42}$ a également été détectée dans le LCR, et de nombreuses analyses ont confirmé une baisse significative du peptide $A\beta_{42}$, pouvant survenir plusieurs décennies avant l'apparition des premiers symptômes. À ce propos, les travaux de Bateman *et al.* (2012), menés sur 128 patients porteurs de mutations des formes familiales de la maladie d'Alzheimer (APP, PSEN1 ou PSEN2), ont aussi montré une diminution du niveau d' $A\beta_{42}$ dans le LCR, détectable 25 ans avant

l'apparition des altérations cognitives. Parallèlement, des dépôts amyloïdes ont également été caractérisés par TEP scan (Figure 7). Ces dernières modifications semblant se produire 15 ans avant l'apparition des premiers symptômes (Bateman *et al.*, 2012; Bousiges *et al.*, 2016).

L'autre biomarqueur à avoir suscité un intérêt croissant dans le diagnostic des phases prodromales de la MA est la protéine Tau. En effet, l'excès de cette protéine dans les stades avancés de la MA a conduit la communauté scientifique à explorer son potentiel pour la détection précoce de la pathologie. De nombreuses études ont confirmé cette hypothèse en mettant en évidence une augmentation de Tau ainsi que de sa forme phosphorylée (pTau) dans le LCR (Andreasen and Blennow, 2005; Bateman *et al.*, 2012). Il est d'ailleurs rapporté que pTau est particulièrement pertinente dans le diagnostic du stade MCI puisqu' elle serait plus spécifique des démences évoluant vers Alzheimer (Buerger *et al.*, 2002).

Outre ces biomarqueurs protéiques prodromaux, d'autres protéines présentes dans le LCR font également l'objet d'une attention particulière. Parmi elles, on retrouve notamment la neurogranine, une protéine post-synaptique impliquée dans les processus de mémorisation. Son expression augmenterait durant le stade MCI et pourrait prédire l'évolution vers le phénotype Alzheimer (Kvartsberg *et al.*, 2015). L'augmentation du niveau des protéines présynaptiques SNAP-25 et synaptotagmine-1, mises en jeu dans la libération des neurotransmetteurs, semblerait également pouvoir prédire la progression du stade MCI vers la maladie d'Alzheimer (Camporesi *et al.*, 2020).

2) Perte synaptique et réduction de la connectivité

En complément de ces biomarqueurs présents dans le LCR ou le plasma, les techniques d'imagerie ainsi que les biopsies de cerveaux réalisées chez des patients MCI, peu de temps après leurs décès, ont révélé d'autres déterminants des phases précoces. Par exemple, une perte synaptique notable a été observé, touchant majoritairement l'hippocampe chez ces patients. Les analyses de microscopie

électronique effectuées par Scheff *et al.* ont montré une réduction de 18 % du nombre de synapses dans le stratum radiatum de la région CA1 de l'hippocampe, chez des patients MCI, dont 55 % ont ensuite été diagnostiqués comme atteints de la maladie d'Alzheimer (Scheff *et al.*, 2006, 2007). Ces résultats ont été corroborés par des acquisitions réalisées par imagerie à résonance magnétique (IRM) chez une vingtaine de patients MCI, qui ont également montré une perte synaptique significative, particulièrement marquée dans la région CA1 de l'hippocampe (Mueller *et al.*, 2010). Parallèlement, des analyses magnétoencéphalographies (MEG) ont montré une diminution de la connectivité fonctionnelle de l'hippocampe chez les patients MCI. Ces études ont révélé une baisse significative des connexions entre l'hippocampe et les structures temporaux-médiales ainsi que les régions occipitales (Figure 8) (López-Sanz *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2020).

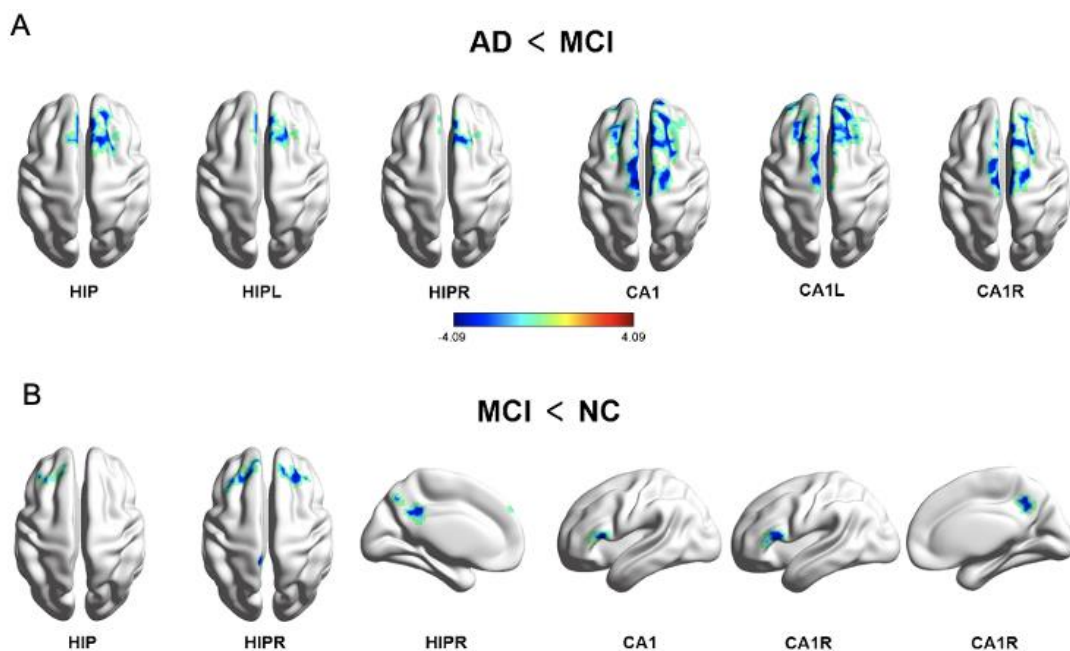


Figure 8 : Diminution de la connectivité fonctionnelle de l'hippocampe (adaptée de Yan *et al.*, 2020). Les régions ont été cartographiées sur la surface du cerveau à l'aide de BrainNet Viewer. Les résultats montrent une réduction de la connectivité fonctionnelle sous-régionale de l'hippocampe dans la Maladie d'Alzheimer (AD) par rapport au stade MCI (A) et une réduction de la connectivité du stade MCI par comparaison aux patients sains (NC) (B). Les couleurs se rapportent à l'échelle des scores t indiquée sur la figure.

3) Hyperactivité neuronale

Une perte synaptique importante, comme mentionné précédemment, peut engendrer des perturbations dans la transmission neuronale. Par conséquent, les neurones survivants doivent compenser et assurer la transmission au sein des circuits hippocampiques modifiés par la neurodégénérescence. Cette observation a conduit à l'hypothèse d'une modification de l'activité neuronale au stade prodromal. En effet, en utilisant l'IRM fonctionnelle (IRMf) chez des patients atteints de MCI, l'activité de l'hippocampe a été mesurée. Plusieurs études ont mis en évidence une hyperactivité neuronale, se traduisant par une activation accrue de l'hippocampe lors de tests de mémorisation. De manière intéressante, cette hyperactivité, observée au début du stade MCI, évolue ensuite vers une hypoactivité similaire à celle observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Dickerson *et al.*, 2005; Celone *et al.*, 2006; Sperling, 2007).

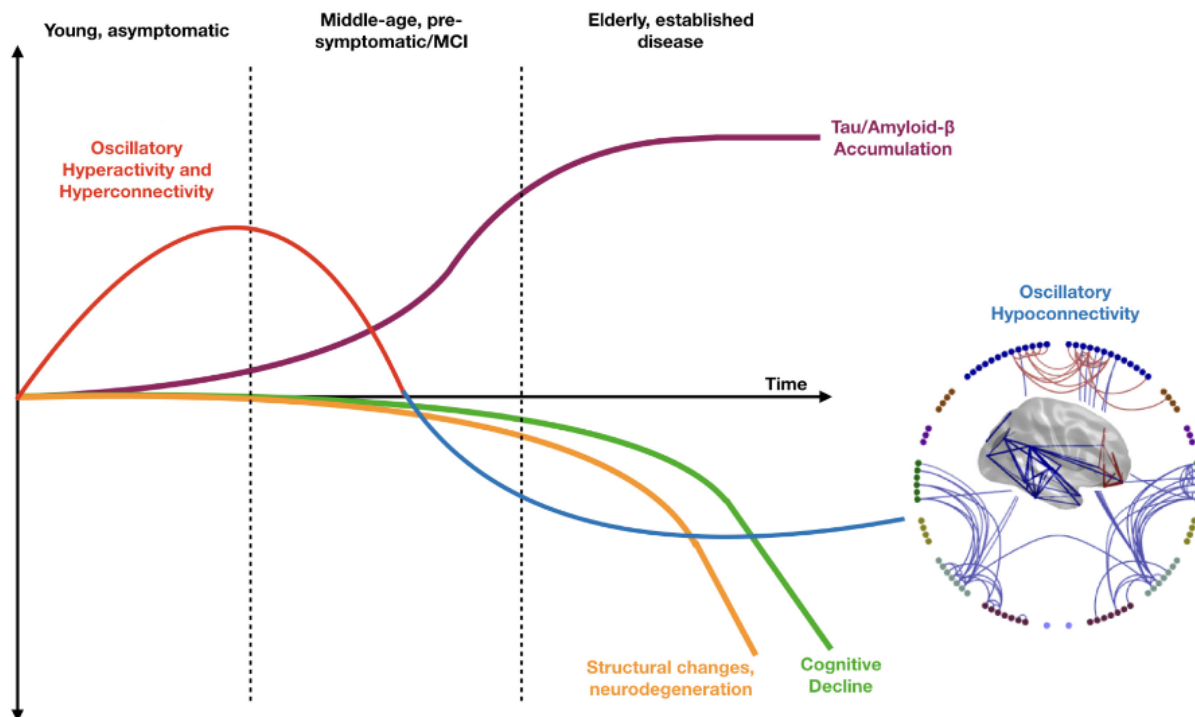


Figure 9: Évolution potentielle des biomarqueurs et de l'hyperactivité neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer (adaptée de Koelewijn *et al.*, 2019). La courbe rouge représentant l'hyperactivité neuronale est l'un des premiers événements caractérisés chez les patients. L'activité excessive est perceptible au début du stade prodromal et évoluera en hypoactivité à mesure que la pathologie se développe. Parallèlement à cette hyperactivité, l'expression des biomarqueurs protéiques, illustrée par la courbe violette, augmente rapidement dès le stade MCI.

Le maintien d'une hyperactivité comme signe précurseur de la maladie d'Alzheimer peut sembler contradictoire alors que le nombre de synapses et la connectivité hippocampique diminuent. Cette association paradoxale a d'abord été interprétée comme un mécanisme de compensation temporaire, où les neurones tentent de contrer les perturbations sans provoquer de déclin cognitif notable. Cependant, l'hyperactivité hippocampique observée par Quiroz *et al.* (2010) chez des patients porteurs de mutations familiales d'Alzheimer, comme la mutation PS1, suggère que l'hyperactivité joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie (Quiroz *et al.*, 2010; Sepulveda-Falla, Glatzel and Lopera, 2012).

Il paraît intéressant de noter que cette hyperactivité chez les patients MCI peut provoquer des crises d'épilepsie, contribuant à l'aggravation des troubles cognitifs (Vossel *et al.*, 2016). Le risque accru de crises d'épilepsie chez les patients atteints d'Alzheimer a été bien documenté, avec une prévalence atteignant jusqu'à 64% (Palop, 2009; Vossel *et al.*, 2017).

En résumé, bien que diagnostiquer le stade prodromal de la maladie d'Alzheimer reste difficile en raison de la variabilité des symptômes, les études rétrospectives ont permis d'identifier plusieurs biomarqueurs du stade MCI. Parmi eux, la diminution du peptide $A\beta_{42}$ et l'augmentation de la protéine Tau, détectables dans le plasma et le LCR plusieurs années avant l'apparition des premiers troubles cognitifs. En parallèle, les techniques d'imagerie fonctionnelle ont révélé une hyperactivité neuronale, accompagnée d'une perte synaptique et d'une diminution de la connectivité dans l'hippocampe (Figure 9).

De façon intéressante, la régulation de cette hyperactivité précoce semble avoir des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives à long terme (Bakker *et al.*, 2012). Comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à cette hyperactivité, ainsi que le développement de thérapies capables de la moduler, constitue désormais un enjeu clé dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer, dans lequel mes travaux de thèse s'inscrivent.

E. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

1) Les caractéristiques neuropathologiques

Les stades les plus avancés de la maladie d'Alzheimer se caractérisent par une atrophie significative du parenchyme cérébral, principalement observable au niveau du cortex et de l'hippocampe, deux structures centrales dans les processus de mémoire et d'apprentissage (Figure 10).

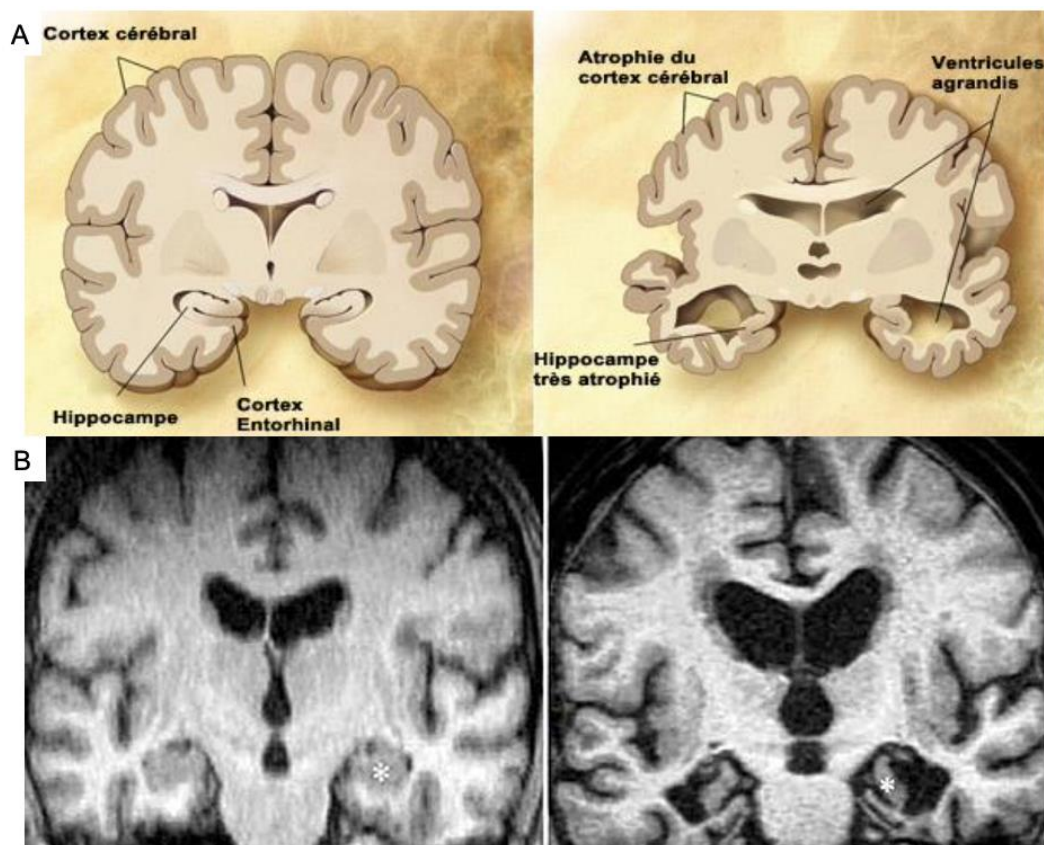


Figure 10 : Modification du tissu cérébral pendant les stades tardifs de la maladie d'Alzheimer (sources: lecerveau.mcgill.ca (panneau A) et *Technical and Historical Perspectives of Remote Sensing* (panneau B)). Le panneau A représente le schéma d'une coupe transversale de cerveau humain sain (gauche) et de son évolution lors des stades avancés de la pathologie avec une atrophie majeure du cerveau et la dilatation des ventricules (droite). Le panneau B correspond à l'IRM montrant, à gauche le cerveau d'un patient sain et à droite, le cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

Chez les patients, on estime que cette atrophie progresse en moyenne de 2% chaque année à l'échelle du cerveau entier (Boyes *et al.*, 2006; Sluimer *et al.*, 2008). Au niveau de l'hippocampe, la perte de volume peut atteindre 24% chez des patients entrant dans le stade sévère de la pathologie (Shi *et al.*, 2009). Cette atrophie est le

résultat d'une neurodégénérescence importante dans ces régions et s'accompagne d'un élargissement de la taille des ventricules cérébraux. Outre les modifications importantes du volume cérébrale, dont l'évolution est appréciable grâce aux techniques d'IRM, le diagnostic final repose sur la présence de deux lésions caractéristiques précédemment évoquées :

-les plaques amyloïdes extracellulaires, formées majoritairement d'agrégats insolubles du peptide A β .

-les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires (DNFs), constituées principalement d'agrégats de protéines Tau anormalement hyperphosphorylée.

Ces deux lésions, déjà observées par Alois Alzheimer, vont évoluer et se répandre dans la majorité des régions cérébrales ([Figure 11](#)) (Ballard *et al.*, 2011; Jouanne, Rault and Voisin-Chiret, 2017).

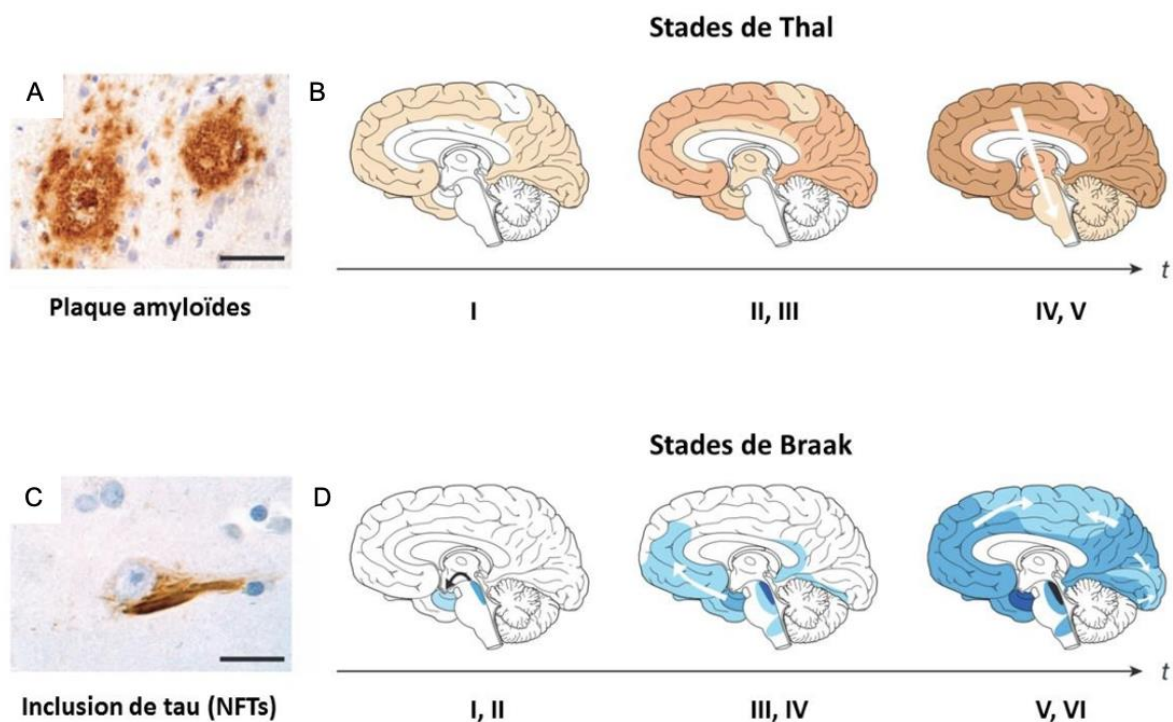


Figure 11 : Évolution spatio-temporelle des lésions de la maladie d'Alzheimer selon Braak et Thal (Jouanne *et al.*, 2017). A: Plaques amyloïdes observées dans le néocortex d'un patient Alzheimer ; B: Progression des dépôts amyloïdes selon Thal ; C: Dégénérescences neurofibrillaires ; D: Progression de la pathologie Tau selon Braak. Pour chacune des lésions, le gradient de couleur (du plus clair au plus foncé) témoigne de la sévérité des lésions.

Bien qu'elles puissent coexister, la cinétique de ses lésions et leurs atteintes cérébrales diffèrent. Concernant la formation des dépôts amyloïdes, ils se répartissent selon cinq stades aussi appelés stades de Thal. De façon intéressante, l'apparition

des plaques peut être corrélée anatomiquement et fonctionnellement aux régions cérébrales touchées. Les agrégats sont d'abord localisés au niveau des couches II-V de l'isocortex. Ils vont ensuite s'étendre et gagner le cortex entorhinal et l'hippocampe suivi de l'amygdale et du reste des aires corticales. Enfin, ce sont les structures plus profondes telles que le thalamus, le striatum ou les noyaux cholinergiques qui vont être touchées (Thal et al., 2002).

Si l'on s'intéresse aux DNFs, celles-ci apparaissent tout d'abord dans le *locus coeruleus* et les aires du système limbique comme le thalamus et l'amygdale avant de rejoindre le cortex. L'évolution des atteintes cérébrales est définie selon les six stades de Braak. L'étendue des symptômes est étroitement liée à la propagation anatomique et au nombre de DNFs dans le cortex (Braak and Braak, 1991; Ingelsson *et al.*, 2004).

En plus de ces lésions caractéristiques, les stades avancés de la maladie se distinguent par la présence d'inflammations mettant en jeu les astrocytes et les cellules microgliales. Ces cellules participeraient au maintien d'un environnement pro-inflammatoire qui, à termes, pourrait perturber la transmission synaptique et compromettre l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Sweeney, Sagare and Zlokovic, 2018; Leng and Edison, 2021; Onyango *et al.*, 2021).

2) La pathologie amyloïde

a) Production du peptide β -amyloïde

Depuis la découverte du gène APP en 1987, la protéine APP a fait l'objet d'études considérables notamment par son implication dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans le développement cancéreux (Lee *et al.*, 2021). La protéine précurseur de l'amyloïde est une glycoprotéine transmembranaire de type I que l'on retrouve en abondance dans le SNC. Cette protéine de 130 kDa fait partie de la famille des protéines associées à l'APP qui comprend également les protéines de type précurseur amyloïde 1 et 2 (APLP1 et APLP2) exprimées principalement chez les mammifères. Parmi ces isoformes, ce sont les trois formes comprenant 695, 751 ou 770 acides aminés (APP695, APP751 et APP770) qui conduiront à la production du peptide β -

amyloïde (O'Brien and Wong, 2011). A l'échelle des neurones, c'est la forme prédominante est l' APP695, dont l'expression est particulièrement enrichie au niveau des synapses (Zheng and Koo, 2011; G. Chen *et al.*, 2017). Cette protéine APP peut être clivée selon deux voies distinctes, la voie non- amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique.

-Voie non- amyloïdogénique

La première voie, appelée non-amyloïdogénique, ne conduit pas à la production du peptide A β (Figure 12) Dans cette voie, l'APP, localisé soit dans le compartiment endosomal soit au niveau de la membrane plasmique, est successivement clivée par deux enzymes, l' α -sécrétase et la γ -sécrétase (Nunan and Small, 2000; Lichtenthaler, 2011). Le premier clivage, réalisé par l' α -sécrétase, une protéine transmembranaire appartenant à la famille des *A Disintegrin And Metalloprotein* (ADAM), produit deux fragments (Fahrenholz, 2007). Le premier est le fragment soluble APP- α (sAPP α) impliqué dans la synaptogenèse ainsi que la formation de la mémoire. Le deuxième est un fragment transmembranaire de 83 acides aminés appelé C83 ou encore fragment C-terminal de l'APP (CTF α) (Hartl *et al.*, 2013). Ce clivage, se produisant à l'intérieur de la séquence de l'A β , empêche ainsi la production du peptide. Par la suite, le fragment C83 est clivé par la γ -sécrétase, un complexe protéique transmembranaire contenant la nicastrine, le domaine *anterior pharynx defective-1* (Aph-1), la *preseniline enhancer-2* (Pen-2) et le site actif de l'enzyme constitué de la préséniline (PS1 ou PS2) (Kimberly and Wolfe, 2003; Hur, 2022). Ce second clivage génère un peptide soluble nommé P3 ainsi que le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la régulation de l'homéostasie calcique et le control du trafic neuronal (Hamid *et al.*, 2007; Pardossi-Piquard and Checler, 2012).

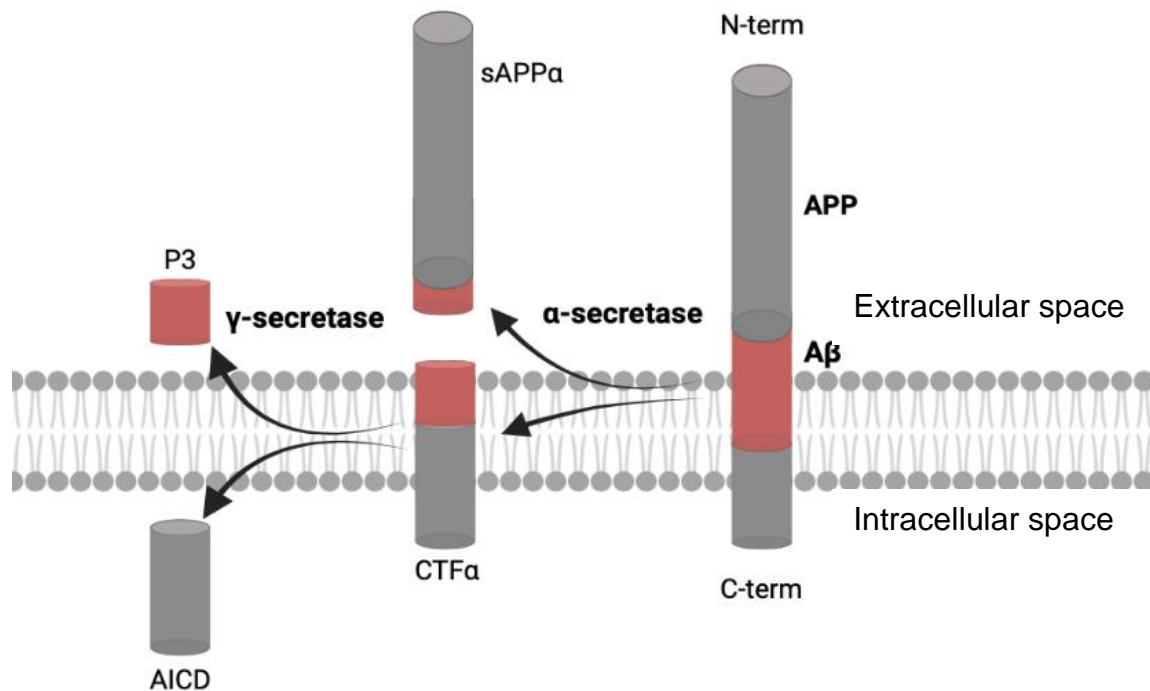


Figure 12: Voie non amyloïdogénique. La protéine APP va subir deux clivages successifs. Le premier s'effectue à l'intérieur de la séquence de l'Aβ et permet l'obtention des fragments CTF-α et sAPPα. A la suite du au second clivage réalisé par la γ-sécrétase, les produits finaux de cette voie non-amyloïdogénique sont le peptide p3 et le fragment AICD. (Figure réalisée sur BioRender.com)

-Voie amyloïdogénique

Comme la voie non-amyloïdogénique précédemment décrite, la voie amyloïdogénique correspond à deux clivages successifs de la protéine APP (Figure 13). Le premier clivage est effectué par la β-sécrétase, une protéase membranaire également appelée BACE1 (Beta-site Cleaving Enzyme 1). Cette enzyme dont l'activité protéolytique dépend de deux sites actifs aspartyles situés en D93 et D289 (A. Armstrong, 2019). Avec un pH optimal de 4,5, BACE1 est principalement localisée dans des environnements acides tels que les endosomes (Shimizu *et al.*, 2008). Deux fragments résultent de ce premier clivage : le fragment soluble APP-β (sAPPβ), sécrété au niveau extracellulaire, et le fragment C-terminal de l'APP (β-CTF) qui restera ancré dans la membrane. Ce dernier sera ensuite clivé par la γ-sécrétase générant le peptide Aβ, principal composant des plaques amyloïdes, ainsi que le fragment AICD (Kamenetz *et al.*, 2003).

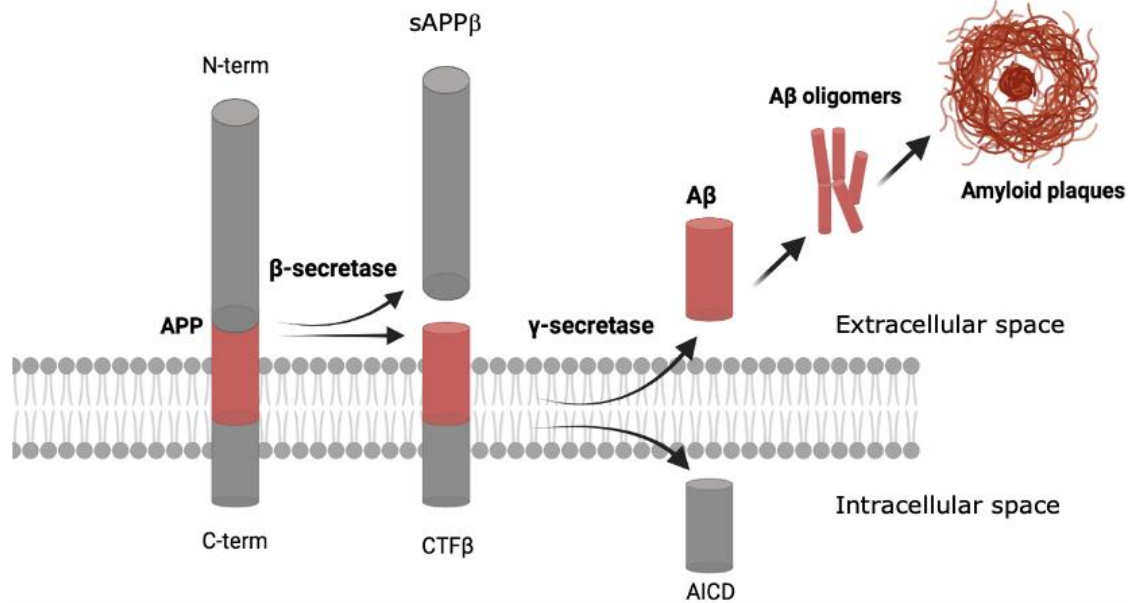


Figure 13: La voie amyloïdogénique. La production du peptide A β résulte de l'action successive de deux enzymes la β -sécrétase et la γ -sécrétase. La β -sécrétase va d'abord cliver l'APP en deux fragments à savoir le sAPP β et le CTF β . Le CTF β nouvellement synthétisé sera à son tour cliver par la γ -sécrétase, permettant ainsi l'obtention du fragment AICD, et la libération de peptide A β qui pourra alors s'oligomériser et dans les stades plus tardifs former des plaques extracellulaires. (Schéma réalisé sur BioRender.com).

b) Oligomérisation et formation des plaques amyloïdes

Une fois produits, les monomères d'A β nouvellement synthétisés vont rapidement s'oligomériser en raison de leur forte hydrophobicité (Figure 13). Différentes formes vont alors émerger. Les premiers vont former des oligomères de faible poids moléculaires, allant de 6 à 12 kDa, correspondant aux formes dimériques ou trimériques (Hartley *et al.*, 1999). Ces oligomères se regroupent ensuite en structures de haut poids moléculaires, qui finissent à leur tour par former des assemblages insolubles tels que les protofibrilles et les fibrilles (LaFerla, Green and Oddo, 2007).

Le peptide A β est majoritairement produit sous deux isoformes, l'A β_{40} et l'A β_{42} , constituées de 40 ou 42 acides aminés, respectivement. Ces deux isoformes diffèrent par l'ajout d'une Alanine et d'une Isoleucine localisées au niveau C terminal créant une

structure en épingle à cheveux- β . Selon les travaux de Sgourakis *et al.* (2007), cette conformation favoriserait l'agrégation de l' $A\beta_{42}$ en fibrilles, conférant à cette isoforme des propriétés pathogènes accrues par rapport à l' $A\beta_{40}$ dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Sgourakis *et al.*, 2007). De nombreuses études réalisées sur des cerveaux de patients Alzheimer ont d'ailleurs montré que l'isoforme $A\beta_{42}$ est la principale retrouvée dans les plaques amyloïdes (Gravina *et al.*, 1995; Iwatsubo *et al.*, 1995).

Bien que la présence des plaques amyloïdes soit encore utilisée pour la confirmation du diagnostic *post-mortem* et constitue l'une des caractéristiques histologiques de la MA, l'hypothèse selon laquelle ces plaques jouent un rôle central dans l'apparition de la pathologie a depuis été écartée, leur présence n'étant pas toujours synonyme de maladie (Dickson *et al.*, 1992). Des études ont effectivement montré une très faible corrélation entre la présence de ces plaques séniles et la mort neuronale résultant de la pathologie (Benilova, Karran and De Strooper, 2012). Certaines études leur confèreraient même un rôle protecteur dans lequel ces lésions agirait comme un « filet » permettant de séquestrer le peptide $A\beta$ et ralentir son oligomérisation (Reiss *et al.*, 2018). Au regard de ces dernières observations, c'est donc sur l'accumulation cérébrale des formes oligomériques du peptide $A\beta$, notamment au niveau de structure comme l'hippocampe, que l'attention s'est portée. Pour étudier ces phénomènes, divers modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont été développés.

E. Modèles animaux

Au travers de cette première partie introductive, nous avons pu entrevoir une partie des mécanismes cellulaires d'origine amyloïdes impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Leur complexité rend cette pathologie difficile à comprendre, mais la découverte de mutations familiales chez l'Homme a permis de concevoir des modèles animaux présentant des caractéristiques physiopathologiques spécifiques. Ces modèles, et en particulier les modèles murins, ont été essentiels pour les progrès réalisés dans la compréhension et la prise en charge de la maladie. À ce jour, 227 modèles murins de la MA ont été répertoriés, la

plupart étant des modèles « humanisés » (Hall and Roberson, 2012). Les gènes humains insérés incluent ceux associés aux formes familiales de la MA, tels que les gènes APP, PSE1 et PSE2. Ce recours à la transgénèse est nécessaire en raison de la faible pathogénicité de l'A β murin. En effet, chez les rongeurs, le peptide A β endogène diffère de celui de l'Homme par trois acides aminés (R5G, Y10F, et H13R), ces différences génétiques modifiant les caractéristiques du peptide murin, qui, contrairement au peptide humain, ne forme pas d'agrégats et n'est donc pas toxique.

Modèle murin APP/PS1-21

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai utilisé le modèle de souris transgénique APP/PS1-21 qui a été généré par le laboratoire du professeur Mathias Jucker (Radde *et al.*, 2006). Ces souris expriment deux transgènes humains qui sont celui de l'APP contenant la mutation Swedish correspondant à la double mutation K670N/M671L, et celui de la PS1 avec la mutation L166P. Les deux mutations sont sous le contrôle du même promoteur neuronale Thy-1 (*thymocyte differentiation antigen 1*). L'utilisation du promoteur Thy-1 permet une expression constante des mutations dans le cerveau adulte des souris et notamment au niveau de l'hippocampe, la structure étudiée au cours de mon doctorat. Cette expression commence au 14^{ème} jours postnatal, ce qui permet d'éviter la survenue d'éventuelles altérations embryonnaires (Porrero *et al.*, 2010).

La caractérisation du modèle APP/PS1-21 effectuée par Radde *et al.*(2006) a montré que la mutation APP_{Swedish} entraîne une production d'APP humain estimée à trois fois celle de l'APP murin (Radde *et al.*, 2006). Pour rappel, cette mutation située à proximité du site de clivage de l'APP par la β -sécrétase, favorise le clivage de l'APP et augmente ainsi considérablement la production du peptide A β (Zhou *et al.*, 2022). Concernant la mutation de la PS1, celle-ci entraîne une modification du fonctionnement de la γ -sécrétase qui conduit à un clivage favorisant la production de la forme A β ₄₂ par rapport à l'A β ₄₀, dont les quantités sont détectables dans le cerveau des souris âgées de 1 mois (Koch *et al.*, 2012). La surproduction du peptide A β résultant de l'expression des deux transgènes aura comme conséquence l'apparition précoce de certaines caractéristique physiopathologique associées à la maladie

d'Alzheimer (Figure 14). L'utilisation de ces souris est donc pertinente au regard de mes travaux qui se consacrent à l'étude des effets précoces de la surproduction du peptide A β sur la transmission synaptique hippocampique.

D'un point de vue phénotypique, les premières modifications détectables chez les souris APP/PS1-21 se produisent dès 1 mois. À cet âge, une hyperactivité hippocampique a été mise en évidence. Celle-ci évoluera par la suite en hypoactivité à partir de 3 mois (Paumier *et al.*, 2022). À partir de 6 semaines, une augmentation de l'astroglie est observable parallèlement aux premiers dépôts amyloïdes, qui sont identifiables dans le cortex avant d'apparaître au niveau de l'hippocampe entre 3 et 4 mois. Une perte synaptique a également été détectée à 3 mois, précédant l'apparition des premiers troubles cognitifs et la neurodégénérescence dont l'apparition est estimé à 7 et 17 mois respectivement (Serneels *et al.*, 2009; Rupp *et al.*, 2011; Bittner *et al.*, 2012).

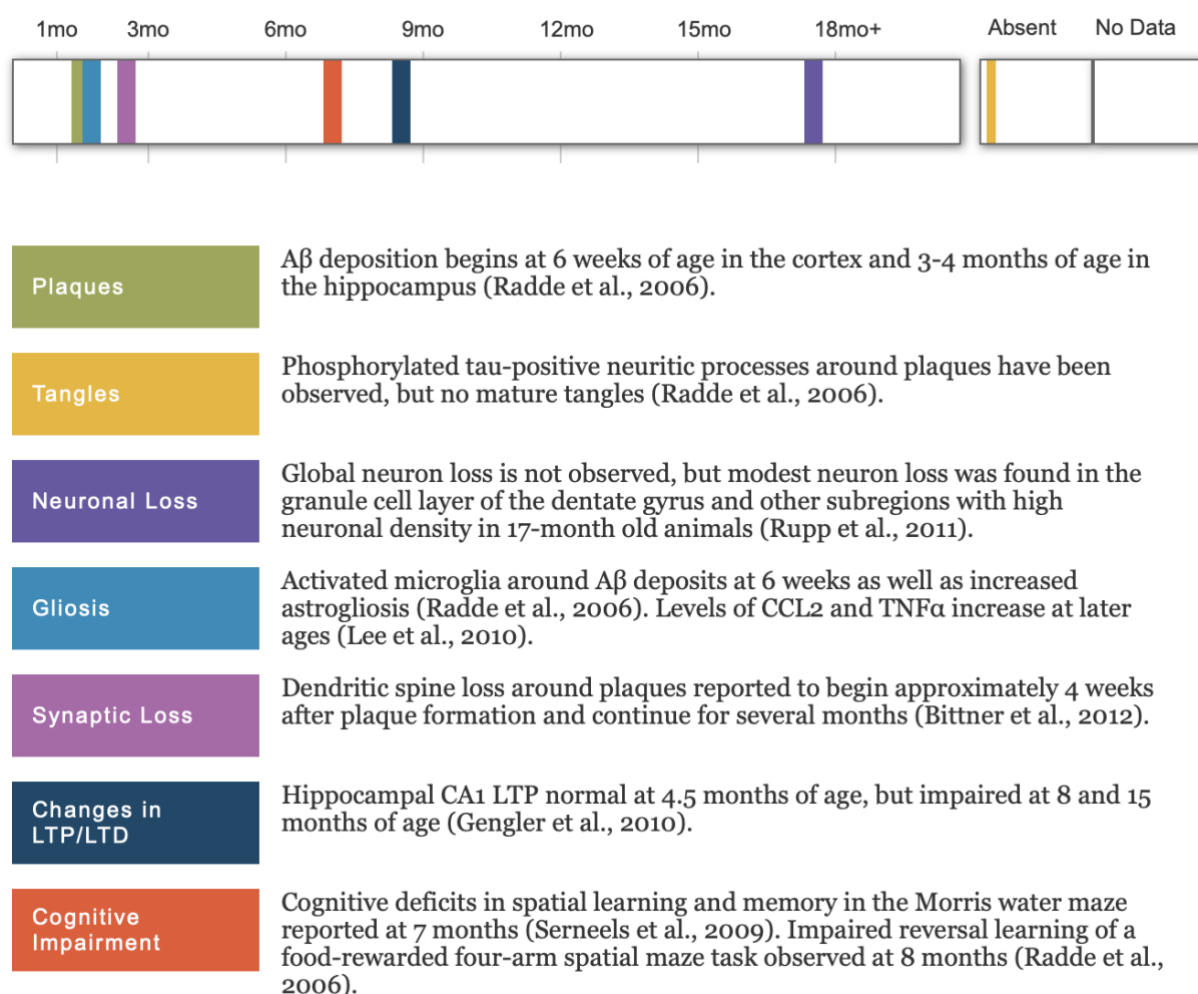


Figure 14 : Caractérisation phénotypique du modèle murin APP/PS1-21 (Source : Alzforum.org).

Plusieurs éléments sont remarquables, notamment une perte neuronale très tardive et détectable uniquement au niveau du gyrus dentelé. De manière intéressante, la cinétique d'apparition des différentes modifications chez la souris est différente de l'évolution que l'on connaît chez l'Homme. Par exemple, l'apparition des plaques amyloïdes, qui est phénomène tardif chez l'Homme, semble précéder la perte synaptique chez la souris. Enfin, la particularité de ce modèle réside également dans l'absence de dégénérescence neurofibrillaire (DNF), l'une des caractéristiques histologiques de la maladie d'Alzheimer.

L'utilisation de modèles murins est essentielle dans le cadre des recherches portant sur la MA. Cependant, il est primordial de garder à l'esprit que les modèles utilisés ne reproduisent qu'une partie des caractéristiques et sont donc plus adaptés à l'étude de processus ponctuels et définis dans le temps. Dans le cas des modèles amyloïdes, une première limitation réside dans les mutations exprimées. En effet, se sont principalement les mutations des formes familiales de la MA qui sont exprimées. Or, ces mutations n'ont été identifiées que chez une très faible minorité des patients. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouveaux modèles qui se rapprochent des formes sporadiques de la maladie.

Le groupe de Rentsch *et al.* (2024) a récemment abordé ce problème en générant le modèle hA β -KI. Ces souris knock-in expriment le peptide A β WT humain et reçoivent une injection hebdomadaire de lipopolysaccharide (0.2 mg/kg) pendant 24 semaines. Ce modèle sporadique a été comparé au modèle des formes familiales hAPP-J20. Après 24 semaines, les deux groupes de souris présentaient des défauts de la mémoire spatiale et une baisse significative du nombre d'épines dendritiques. En revanche, aucun dépôt amyloïde n'a été observé chez les souris hA β -KI (Rentsch *et al.*, 2024). D'autres modèles de souris knock-in très similaires ont été proposés (Baglietto-Vargas *et al.*, 2021). Toutefois, bien que les modèles murins présentent des caractéristiques cognitives et pathologiques significatives, la plupart d'entre eux ne montrent ni plaques amyloïdes ni mort neuronale. Une autre limitation importante des modèles murins est la vulnérabilité différentielle des neurones humains par rapport à ceux des souris face à la maladie d'Alzheimer. Balusu *et al.* (2023) ont démontré cette différence en xénogreffant des neurones humains dans le cerveau de souris présentant des plaques amyloïdes. De manière surprenante, seuls les neurones

humains ont exprimé des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer et ont montré la présence de DNFs (Balusu *et al.*, 2023).

Si les modèles murins de la maladie d'Alzheimer restent imparfaits, la diversité des souris générées a de toute évidence permis d'accroître significativement notre compréhension. Cette avancée a conduit au développement de nombreuses stratégies thérapeutiques, que nous allons maintenant aborder.

F. Stratégies thérapeutiques

Depuis sa découverte en 1907, l'amélioration de notre compréhension sur la maladie d'Alzheimer et son évolution ont permis d'améliorer considérablement sa prise en charge. Néanmoins, il n'existe encore aucun traitement capable de guérir cette pathologie, et les stratégies thérapeutiques proposées sont toujours confrontées à la difficulté majeure de la précocité du diagnostic. Bien que de nombreux médicaments soient actuellement en phase de test clinique, aucune des molécules proposées n'a pour l'instant démontré des résultats suffisamment satisfaisants pour être validée en tant que traitement curatif.

En revanche, quatre médicaments permettant de ralentir l'évolution de la maladie et d'atténuer les troubles cognitifs sont disponibles : le donépézil, la rivastigmine, la galantamine et la mémantine (Howard *et al.*, 2015; Hommet *et al.*, 2016). Les trois premiers composés sont des inhibiteurs de la cholinestérase, qui aident à maintenir la transmission cholinergique altérée au cours de la maladie. La mémantine, quant à elle, est un inhibiteur des récepteurs postsynaptiques NMDA qui permet de diminuer la transmission glutamatergique anormalement élevée dans le cadre de la pathologie Alzheimer.

Si les effets de ces traitements sur les symptômes cognitifs sont avérés, ils interviennent à un stade où les lésions neuronales sont déjà importantes et irréversibles. Il paraît donc important de cibler les phases précoces de la maladie afin de ralentir son évolution en empêchant l'activation des mécanismes pathologiques à son origine. Parmi les stratégies thérapeutiques qui sont actuellement en essai, on peut distinguer deux catégories. La première est l'immunothérapie et consiste à réduire la formation des lésions amyloïdes (plaques séniles) et de la protéine Tau (dégénérescences neurofibrillaires).

1) L'immunothérapie

Depuis les années 2010s, les progrès effectués dans le domaine de l'immunothérapie ont révolutionné la prise en charge de certaines maladies notamment les cancers comme le mélanome ou le cancer du poumon. De ce fait, cette stratégie est devenue l'une des méthodes les plus prometteuses pour prévenir la progression de la maladie d'Alzheimer. En effet, en ciblant directement le peptide A β ₄₂ ou les agrégats de la protéine Tau, l'objectif est double : d'une part, empêcher l'apparition des premières lésions à l'origine de la pathologie, et d'autre part, atténuer les troubles cognitifs des patients. Cette approche a favorisé l'émergence de nouvelles molécules dont les effets sur les lésions, en particulier les lésions amyloïdes, sont encourageants (Figure 15) (Valiukas *et al.*, 2022).

Compound	Phase	Target	Type	Participants	Findings
Aducanumab	Ib	A β	mAb	197	Reduced A β , did not improve cognition.
Bapineuzumab	III	A β	mAb	1121, 1331	Did not improve cognition, did not reduce A β deposition.
Solanezumab	III	A β	mAb	2052	Did not improve cognition, Levels of A β ₄₀ decreased, A β ₄₂ did not change.
Gantenerumab	III	A β	mAb	799	Study halted due to no effect on cognition or A β deposition.
Crenezumab	II	A β	mAb	448	No effect on cognition, elevated CSF levels of A β were associated with treatment.
Lecanemab	II	A β	mAb	854	Treatment showed a reduction in A β and a reduction in cognitive decline over an 18-month period, missing 12-month primary endpoints.

Figure 15 : Liste des anticorps monoclonaux actuellement à l'essai et leurs limitations (Valiukas *et al.*, 2022). Dans l'ensemble, si certain des traitements peuvent influencer le dépôt du peptide A β , l'objectif principal d'améliorer ses symptômes cognitifs n'est pas atteint.

Actuellement le seul traitement à avoir été approuvé au Etats-Unis est l'aducanumab. Cet anticorps monoclonal est une IgG1 humaine qui reconnaît l'A β agrégé/fibrillaire (Sevigny *et al.*, 2015). Les effets de l'aducanumab ont été évalués en 2012, dans une étude nommée *PRIME*, réalisée chez 166 personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer à un stade prodromal ou léger. Les sujets ont été randomisés pour recevoir un placebo, 1mg, 3mg, 6mg ou 10mg d'aducanumab avec des perfusions toutes les 4 semaines sur une période de 52 semaines. L'impact du traitement sur les dépôts amyloïdes a été évalué par TEP scan à la semaine 24 et à la fin de l'essai. Initialement, une réduction significative du volume des plaques amyloïdes avait été rapporté, mais les effets indésirables, notamment l'apparition d'œdèmes cérébraux et le manque d'effet sur les symptômes cognitifs, ont entraîné l'arrêt momentané de cette étude (Sevigny *et al.*, 2016). Cependant, en 2019, les

recherches ont été relancées dans un nouvel essai de phase 3 appelé *Emerge* incluant 1350 patients. Si la réduction des plaques amyloïdes a été confirmée, c'est surtout l'amélioration des symptômes cognitifs des patients qui doit être souligné. En effet, le déclin des activités de la vie quotidienne, normalement causé par la maladie, a été réduit de 40 % en comparaison du groupe ayant reçu un placebo (Walsh and Selkoe, 2020). Quoi qu'il en soit, cet essai est très encourageant puisqu'il est le premier à montrer certains avantages cliniques sur des mesures telles que le score MMSE en plus d'une réduction significative des plaques amyloïdes. Il constitue donc une avancée majeure dans les traitements d'immunothérapie ciblant les dépôts amyloïdes.

De manière similaire à l'A β , la protéine tau hyperphosphorylée, principale composante des DNFs, représente également une cible intéressante pour les approches immunothérapeutiques de la maladie d'Alzheimer. Des études précliniques, datant de 2007 et 2010, réalisées sur des modèles mutants de tauopathie, ont montré des résultats prometteurs quant à la réduction de la charge des DNFs (Asuni *et al.*, 2007; Boutajangout *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2011). Depuis, d'autres approches comparables ont été développées, menant à la création de deux vaccins ciblant respectivement la protéine tau non phosphorylée (AADVac1) et la protéine tau phosphorylée (ACI-35) qui ont débutés la phase I (Theunis *et al.*, 2013; Kontsekova *et al.*, 2014).

2) Régulation de l'hyperactivité hippocampique

Comme évoqué précédemment dans ce manuscrit, l'hyperactivité neuronale localisée au niveau de l'hippocampe constitue l'un des marqueurs précoces de la maladie d'Alzheimer. Les recherches visant à réduire cet état hyperactif, qui précède de plusieurs années l'apparition des premiers troubles mnésiques, présentent un véritable potentiel thérapeutique et font donc l'objet d'une attention particulière. Cette dernière assertion fait écho aux travaux de Sanchez *et al.* (2012) montrant que la régulation précoce de l'activité hippocampique serait à l'origine d'une amélioration des performances cognitives chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Sanchez *et al.*, 2012). Dans cette étude, les souris hAPP, présentant une hyperactivité

hippocampique précoce, ont été traitées avec le leveturacetam, un médicament aux propriétés antiépileptiques. En plus de réduire l'hyperactivité, ce traitement semblerait aussi diminuer les déficits d'apprentissage et de mémorisation chez les souris. Ces résultats ont pu être confirmés chez l'Homme par Bakker *et al.* (2012). Au cours de cette analyse, des patients MCI ont reçu le leveturacetam et les résultats d'IRM fonctionnelle ont révélés que la régulation de l'hyperactivité pouvait considérablement améliorer les fonctions mnésiques (Bakker *et al.*, 2012).

En conclusion, ces derniers résultats sont extrêmement encourageants et offrent de nombreuses perspectives de traitement ainsi qu'un espoir dans la lutte menée contre cette pathologie. Afin d'améliorer et d'affiner cette stratégie thérapeutique, il est maintenant crucial de comprendre les mécanismes à l'origine de cette hyperactivité neuronale et d'identifier les acteurs impliqués. Dans la seconde partie de cette introduction, nous aborderons plus en détail la neurotransmission hippocampique et les facteurs qui participent à sa régulation en conditions physiologiques ainsi que dans le contexte pathologique de la maladie d'Alzheimer

Deuxième partie : La neurotransmission dans l'hippocampe

A. Fonctionnement de l'hippocampe

C'est au Dr Julius Caesar Arantius, un chirurgien italien passionné par l'anatomie cérébrale, que l'on doit la première description de la structure cérébrale appelée hippocampe en 1587. Le nom "hippocampe" fait référence à sa forme enroulée, semblable à celle de l'animal marin éponyme. À cette époque, la description de l'hippocampe était encore rudimentaire par rapport à ce que l'on connaît aujourd'hui. Ce n'est que grâce aux travaux ultérieurs d'anatomistes comme Pierre Tarin en 1750 et du neuroscientifique espagnol Lorente de Nó, élève de Santiago Ramón y Cajal, que la structure de l'hippocampe a été précisée et mieux comprise en 1933 (Lorente de Nó *et al.*, 1933)

Le rôle central de l'hippocampe dans les processus de mémorisation et d'apprentissage est désormais largement reconnu. Cette découverte majeure a été faite en 1953, lorsque Henry Molaison, plus connu sous le nom de patient H.M., a subi l'ablation des deux lobes temporaux pour traiter des crises d'épilepsie résistantes aux médicaments. Après l'opération, H.M. a développé une grave amnésie antérograde : bien qu'il se souvienne des événements survenus avant l'intervention, il était incapable de créer de nouveaux souvenirs. Cette observation a conduit la neuropsychologue Brenda Milner et le chirurgien William Scoville à conclure à l'importance cruciale de l'hippocampe dans les processus mnésiques (Scoville & Milner, 1957). Depuis lors, les recherches sur le fonctionnement de l'hippocampe et les progrès des techniques expérimentales ont permis de dévoiler son organisation complexe et son rôle essentiel dans la mémoire.

1) Structure anatomique et circuits hippocampiques

a) Anatomie de l'hippocampe

Chez l'Homme, l'hippocampe est une structure bilatérale sous-corticale présente au niveau de la face médiane du lobe temporal (Figure 16). Cette structure profonde s'étend vers le ventricule latéral et est recouverte en grande partie par la circonvolution parahippocampale. Sur la face dorsale, l'hippocampe est rattaché à la fimbria, un ruban de fibres épaisses qui constituent le fornix et se termine au niveau du corps mamillaire. Avec l'amygdale, le septum et au thalamus, l'hippocampe constitue l'une des structures principales du système limbique qui joue un rôle fondamental dans l'olfaction, les émotions, la mémoire et l'apprentissage (Rolls, 2015).

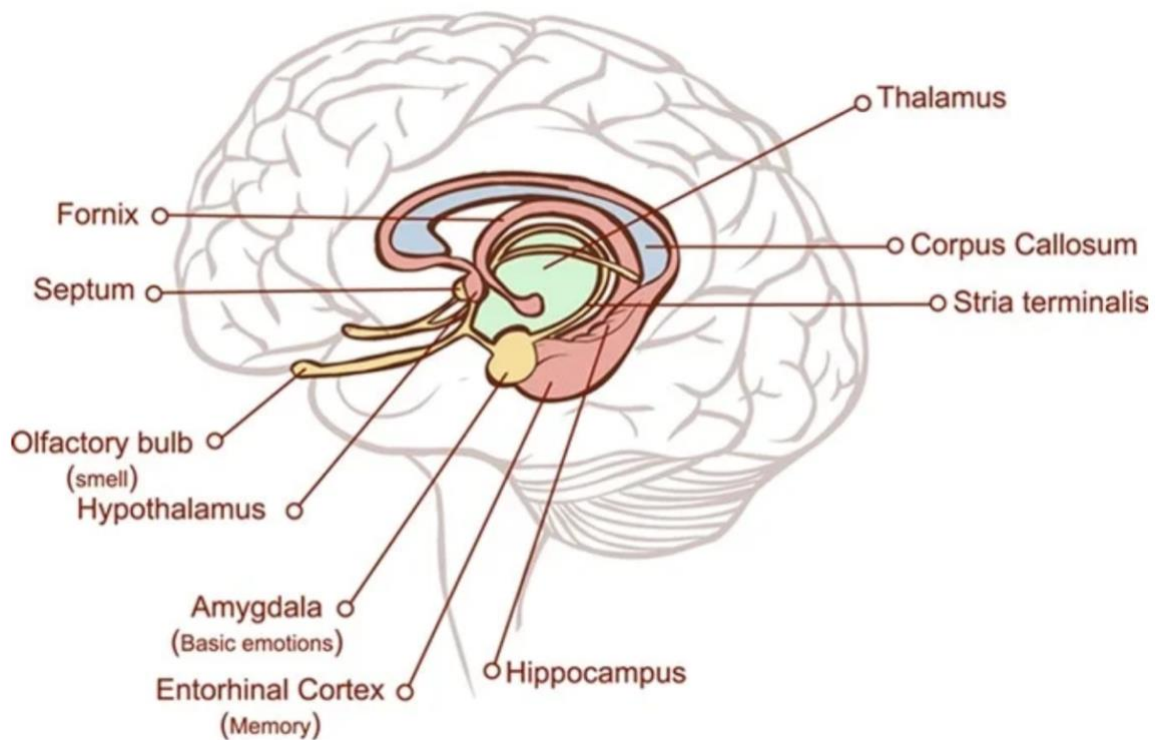


Figure 16 : Localisation de l'hippocampe dans le cerveau humain (Source : Corbac40/Shutterstock). Le schéma représente une coupe transversale du cerveau montrant le système limbique et toutes les structures connectées. L'hippocampe est illustré en rouge.

b) Cytoarchitecture de l'hippocampe

L'hippocampe en tant que structure cérébrale distincte, est constitué de deux replis du cortex imbriqués l'un dans l'autre qui forment *le cornu Ammonis* ou corne d'Ammon (CA) et le gyrus denté (DG) (Figure 17). Cette terminologie est cependant variable puisque certains chercheurs lui associent aussi le *subiculum* ainsi que le cortex entorhinal. La corne d'Ammon est subdivisée en trois parties : CA1, CA2 et CA3, chacune présentant des différences au niveau de ses connexions synaptiques et de sa morphologie. Contrairement au cortex qui est constitué de six couches cellulaires, l'hippocampe se compose de cinq couches dans lesquelles les corps cellulaires sont alignés :

- L'*alveus*, cette couche contient les axones des cellules pyramidales dirigées vers la *fimbria* ou le *subiculum*.
- Le *stratum oriens*, situé entre l'*alveus* et les cellules pyramidales, il est composé des dendrites basales des cellules pyramidales excitatrices ainsi que des interneurons inhibiteurs. Il contient également certaines afférences du *septum*.
- Le *stratum pyramidale*, il renferme majoritairement le corps cellulaire des cellules pyramidales excitatrices de la corne d'Ammon et des interneurons inhibiteurs.
- Le *stratum radiatum*, il contient les segments proximaux de l'arbre dendritique des cellules pyramidales et des interneurons.
- Le *stratum moleculare* se compose des segments distaux de l'arbre dendritique des cellules pyramidales.

Au niveau de CA3, une couche cellulaire supplémentaire a été identifiée. Il s'agit du *stratum lucidum*, localisé entre le *stratum pyramidale* et *stratum radiatum*. Cette dernière reçoit les projections des fibres mossues des cellules granulaires.

Concernant le Gyrus denté, celui-ci se compose de seulement trois couches cellulaires :

- Le *stratum granulosum*, contenant les corps cellulaires des cellules granulaires.
- La couche moléculaire qui regroupe les dendrites apicales des cellules granulaires et leurs afférences
- La couche polymorphique, où les segments initiaux des axones des cellules granulaires se rassemblent pour donner naissance aux fibres moussues. Cette couche contient également des interneurons.

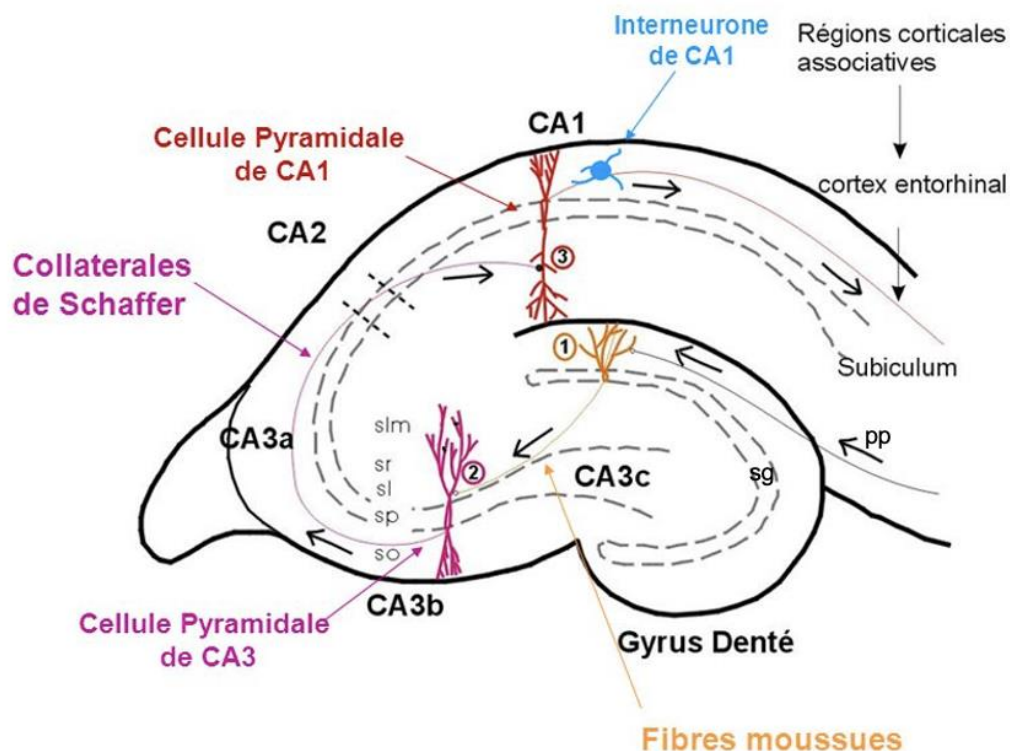


Figure 17 : Structures interne de l'hippocampe (Source : <https://slideplayer.fr/slide/514406/>). Cette illustration présente les différentes couches cellulaires de l'hippocampe et leur organisation. CA: corne d'Ammon, sl: l'alveus, pp: voie perforante, slm: *stratum moleculare*, sg: *stratum granulosum*, so: *stratum oriens*, sp: *stratum pyramidale*, sr: *stratum radiatum*

De façon intéressante, il semblerait que le DG des rongeurs, notamment dans ses parties septale et temporale, soit un lieu de neurogenèse à l'âge adulte (Bekiari *et al.*, 2015). Cette observation a conduit la communauté scientifique à se demander si des propriétés similaires pourraient exister chez l'Homme. Les travaux de Sorrells *et al.* (2018) ont toutefois réfuté cette hypothèse en montrant que la neurogénèse

hippocampique diminuait drastiquement lors des premières années de vie et qu'elle serait inexistante chez l'adulte (Sorrells *et al.*, 2018). Cependant, les recherches plus récentes du groupe de Moreno-Jiménez *et al.* (2021) se sont opposées aux conclusions précédentes en détectant de neurogénèse dans le DG humain. D'après les résultats obtenus, celle-ci se manifesterait tout au long de la vie adulte (Moreno-Jiménez *et al.*, 2021). Il semblerait que les différences de résultats soient en partie imputable aux méthodes de préservation et de fixation des échantillons de cerveau, c'est pourquoi un protocole visant à standardiser l'étude de la neurogénèse a été récemment proposé (Terreros-Roncal *et al.*, 2023).

En considérant l'hippocampe dans son ensemble, diverses catégories de cellules neuronales le composent, à commencer par les cellules pyramidales, en référence à leur forme triangulaire. Elles sont les principales composantes de la couche pyramidale localisée au niveau de la corne d'Ammon. On estime d'ailleurs que ces cellules excitatrices glutamatergiques représentent entre 80 et 90% des cellules neuronales totales. Les 10 à 20% restant correspondent aux interneurons inhibiteurs dont 90% libèrent de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur (Pelkey *et al.*, 2017; Booker and Vida, 2018).

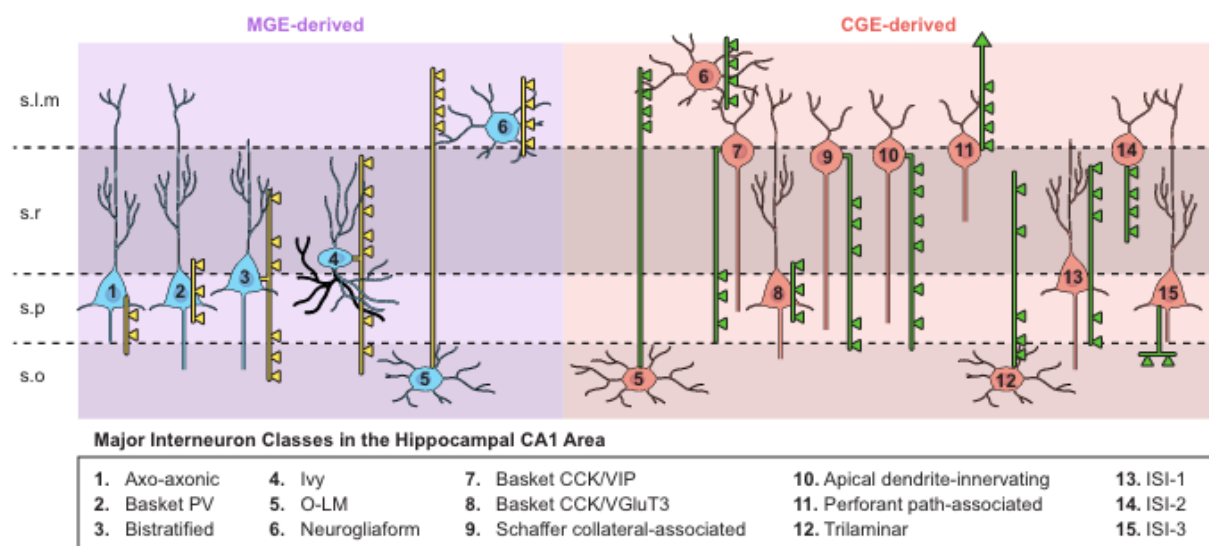


Figure 18: Classification des interneurons de la région CA1 de l'hippocampe (Pelkey *et al.*, 2017). Les sous-types d'interneurones sont analysés en fonction de leur origine dans l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) ou l'éminence ganglionnaire caudale (EGC). Les cellules à double origine sont représentées dans les deux cohortes. Les profils somato-dendritiques sont représentés en couleur uniforme (bleu pour MGE, rouge pour CGE). Les trajectoires d'axones plus fines sont illustrées en jaune (cellules dérivées de la MGE) et en vert (cellules dérivées de la CGE) avec des boutons (triangles) illustrant les domaines principalement ciblés des cellules pyramidales CA1 innervées par chaque sous-type d'interneurone.

Ces interneurones se répartissent au travers des différentes couches de l'hippocampe et adoptent des caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et physiologiques extrêmement variées à l'origine de leur classification (Figure 18). On distingue ainsi cinq groupes d'interneurones répartis entre les cellules en corbeille, localisées dans le *stratum oriens*, les neurones fusiformes, dans la région du hile et les cellules en corbeille de type pyramidale, dans le *stratum granulosum* du gyrus denté. Enfin les deux derniers groupes sont constitués des cellules bipolaires et multipolaires, principalement situées dans le *stratum radiatum* et le *stratum pyramidale*.

En plus de leur classification morphologique, un niveau de complexité supplémentaire s'ajoute avec la capacité, pour certains interneurones, de synthétiser des protéines spécifiques comme la parvalbumine (PV) (Nitsch, Soriano and Frotscher, 1990). D'autres encore peuvent produire des neuropeptides comme la cholécystokinine (CCK), la somatostatine (SOM), le peptide intestinal vasoactif (VIP) ou la substance P (Lorén et al., 1979; Kosaka et al., 1988; Acsády et al., 1997; Giuffrida et al., 2009).

Finalement, plus de vingt sous-types d'interneurones ont ainsi été identifiés uniquement au niveau de la région CA1 (Klausberger and Somogyi, 2008). En plus des neurones, l'hippocampe abrite également d'autres types cellulaires tels que les cellules gliales, qui permettent d'assurer toutes les fonctions énergétiques, homéostatiques et immunitaires essentielles à la fonction neuronale. Les astrocytes représenteraient environ 75% des cellules non-neuronales de l'hippocampe et participent à la constitution de la barrière-hématoencéphalique (Beach, Bathgate and Cotman, 1982). Sont également présents les oligodendrocytes et les cellules de la microglie qui participent à la formation de la gaine myéline et à la phagocytose des déchets cellulaires respectivement.

c) Afférences et efférences de l'hippocampe

Afférences

Nous avons vu précédemment que l'hippocampe constitue l'une des principales structures du système limbique et reçoit de nombreuses afférences provenant de quatre régions principales (Knierim, 2015; Chauhan *et al.*, 2021)(Knierim, 2015; Chauhan *et al.*, 2021) :

- Les afférences provenant du cortex entorhinal, qui transitent en grande partie à travers la voie perforante (Figure 19). Parmi les principales régions cérébrales qui projettent vers l'hippocampe via le cortex entorhinal, on retrouve le cortex préfrontal, le pré-*subiculum*, les cortex temporal et piriforme, ainsi que l'amygdale.
- La deuxième région est l'hippocampe controlatéral, qui se connecte avec son homologue par le biais des fibres commissurales passant par la fimbria.
- Le tronc cérébral constitue la troisième région afférente, avec des fibres provenant du noyau médian du Raphé et du locus coeruleus.
- Enfin, les afférences du septum médian, dont l'origine et les implications fonctionnelles restent encore largement inconnues, représentent la quatrième région.

Efférences

La majeure partie des fibres efférentes de l'hippocampe projettent à travers le fornix. Les axones se regroupent pour atteindre différentes cibles dans le télencéphale et le diencephale, telles que le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire pré optique et le tronc cérébral. Ces projections forment le circuit de Papez, ou circuit hippocampo-mamillo-thalamique, qui fait partie du système limbique évoqué précédemment et qui est impliqué dans la mémoire et les émotions (Parmeggiani, Azzaroni and Lenzi, 1971).

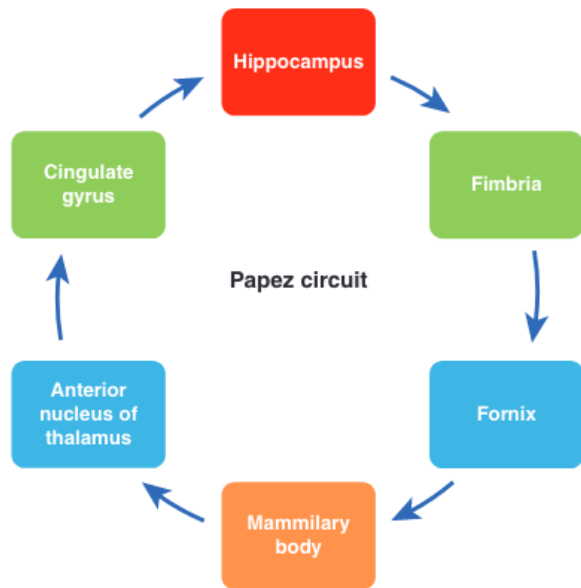


Figure 19: Représentation schématique du circuit de Papez (Chauhan *et al.*, 2021). Ce circuit de Papez représente les principales éférences de l'hippocampe.

Au sein de ce circuit, l'hippocampe se connecte au fornix, qui projette jusqu'aux corps mammillaires pour ensuite atteindre le noyau antérieur du thalamus. L'information parvient ensuite au gyrus cingulaire, puis au cortex entorhinal, avant de retourner à l'hippocampe (Parmeggiani, Azzaroni and Lenzi, 1971; Andersen, Bland and Dudar, 1973). Une autre éférence hippocampique empreinte cette fois-ci le *subiculum* en direction du cortex entorhinal qui projette en direction de différentes aires associatives comme par exemple le cortex préfrontal (Chauhan *et al.*, 2021).

d) Circuit intra-hippocampique

Pour pouvoir recevoir et transmettre l'information neuronale en direction des différentes aires cérébrale, l'hippocampe arbore une architecture interne extrêmement spécifique appelée circuit trisynaptique (Figure 20).

L'organisation de ce circuit excitateur glutamatergique, découvert par Andersen *et al.* 1971, présente de très forte similarité entre l'Homme et le rongeur (Andersen, Bliss and Skrede, 1971). Comme son nom le suggère, il est constitué de trois régions synaptiques à travers lesquelles l'information neuronale va transiter de façon unidirectionnelle. Cette information parvient dans l'hippocampe par l'intermédiaire de la voie perforante qui contient les axones des neurones provenant principalement de la couche II du cortex entorhinal. Ces axones établissent un premier contact synaptique avec les cellules granuleuses du Gyrus denté. Les axones des cellules granuleuses se concentrent à leur tour pour former les fibres moussues qui se

connectent aux neurones pyramidaux de CA3 constituant la deuxième synapse de ce circuit excitateur.

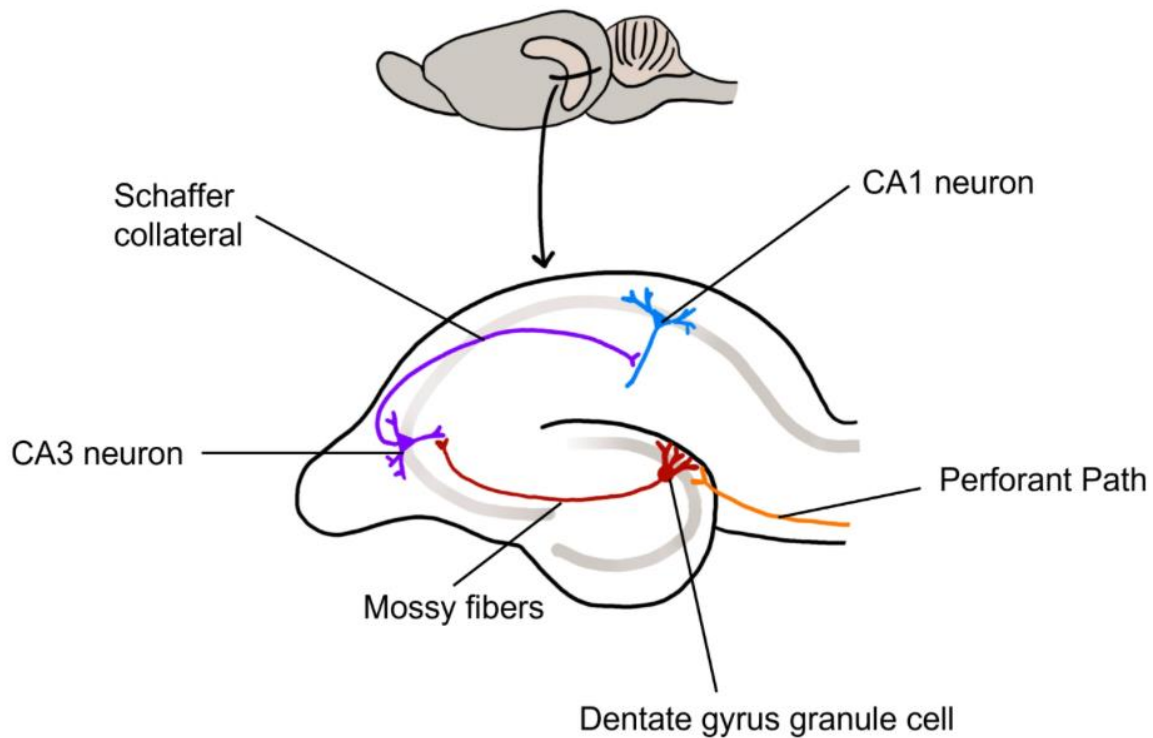


Figure 20 : Circuit trisynaptique de l'hippocampe chez le rongeur (Valerie Hedge, Introduction to Neuroscience 2022). Les neurones du cortex entorhinal servent d'entrée à l'hippocampe. Les axones de ces cellules forment la voie perforante (orange). Les neurones du cortex entorhinal font synapse avec les cellules granuleuses du gyrus denté (rouge). Les cellules du gyrus denté étendent leurs axones, appelés fibres moussues, aux cellules d'une région de l'hippocampe appelée CA3. Les neurones de CA3 (en violet) étendent leurs axones, appelés collatéraux de Schaffer, à une autre région de l'hippocampe appelée région CA1 (en bleu).

Les axones des cellules de CA3, appelés collatérales de Schaffer se projettent en direction des neurones pyramidaux de CA1 avec lesquels ils établissent le troisième et dernier contact synaptique de ce circuit. Enfin, c'est à partir des cellules de CA1 que l'information neuronale quitte l'hippocampe pour regagner le cortex entorhinal ou le *subiculum* et ainsi former une boucle trisynaptique (Naber, Lopes Da Silva and Witter, 2001).

2) Implication de l'hippocampe dans la mémoire

L'hippocampe, en tant que structure essentielle des processus de mémoire et d'apprentissage, est l'une des régions cérébrales les plus étudiées. Depuis l'étude de Henry Molaison, aussi connu sous le nom de patient H.M, de nombreux travaux ont confirmé le rôle fondamental de l'hippocampe dans ces processus cognitifs. Les recherches ont continué à approfondir notre compréhension des mécanismes par lesquels l'hippocampe contribue à la formation, au stockage et à la récupération des souvenirs, consolidant ainsi son importance dans les études neurologiques et psychiatriques.

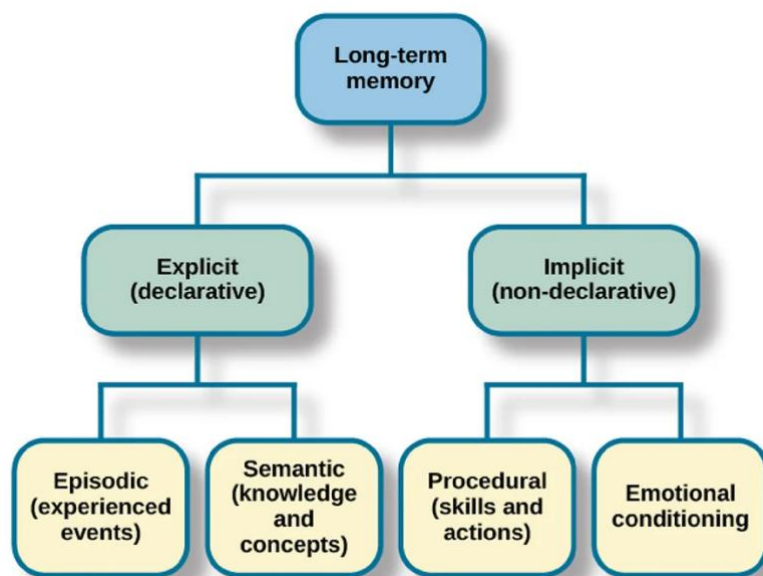


Figure 21 : Classification des différentes sous- catégories de mémoire identifiées chez l'Homme(Patten *et al.*, 2015). L'hippocampe est majoritairement impliqué dans les processus de mémoire déclarative à long-terme.

En 2004, les travaux de Broadbent *et al.* ont permis de classifier la mémoire en diverses sous-catégories, mettant en évidence l'implication de l'hippocampe dans ces processus. Parmi les catégories identifiées, la mémoire déclarative, introduite par Cohen en 1980, joue un rôle crucial (Cohen and Squire, 1980; Broadbent, Squire and Clark, 2004). Cette forme de mémoire est essentielle pour l'apprentissage de nouvelles informations factuelles ou abstraites, permettant la formation rapide et durable d'associations entre stimuli environnementaux, ainsi que la reconnaissance détaillée d'événements et de lieux (Eichenbaum, Otto and Cohen, 1992; Ergorul and Eichenbaum, 2004).

Les recherches de 2004, effectuées chez l'Homme, ont également confirmé l'implication de l'hippocampe dans la mémoire déclarative (Gilbert, Kesner and Lee, 2001; Hunsaker, Rosenberg and Kesner, 2008). La mémoire déclarative, qui fait partie de la mémoire à long terme, peut être subdivisée en deux catégories principales : la mémoire épisodique et la mémoire spatiale (Figure 21) (Broadbent, Squire and Clark, 2004).

Mémoire épisodique

La mémoire épisodique fait référence aux souvenirs d'expériences, d'évènements et de situations. Ce terme a été introduit pour la première fois par le psychologue canadien Endel Tuveing en 1972 (Tulving *et al.* 1972). Au niveau de l'hippocampe, il semblerait que les cellules granuleuses du Gyrus denté soient les principales effectrices de la mémoire épisodique. En effet, des expériences effectuées sur des rats ont montré qu'une lésion dans le DG engendrait une altération des capacités à détecter un nouvel objet dans l'environnement. En revanche, une lésion de CA3 n'avait aucun impact (Gilbert, Kesner and Lee, 2001; Hunsaker, Rosenberg and Kesner, 2008). D'autres expériences plus récentes, utilisant l'otopogénétique pour désactiver spécifiquement les cellules granuleuses, ont conduit à une conclusion similaire (Bernier *et al.*, 2017). Si le Gyrus denté semble être la structure hippocampique centrale de la mémoire épisodique, quand est-il de la mémoire spatiale.

Mémoire spatiale

La mise en jeu de l'hippocampe dans la mémoire spatiale a pour la première fois été décrite en 1971 grâce aux travaux de John O'Keefe et Jonathan Dostrovsky qui ont été récompensés en 2014 par le Prix Nobel de physiologie et médecine (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Au cours de leurs analyses réalisées chez le rat, ils se sont aperçus que différents groupements de cellules, qu'ils nommèrent « cellules de lieu » s'activaient au niveau de l'hippocampe à mesure que l'animal explorait son environnement. Autrement dit, chaque changement de localisation et d'orientation se

traduisait par l'activation d'un groupement spécifique de neurones qui permettrait de « coder spatialement » la trajectoire du rat. La plasticité synaptique, notamment la potentialisation à long terme (LTP), joue un rôle crucial dans cet apprentissage spatial. Les cellules de lieu sont modulées par les neurones du cortex entorhinal, qui fournissent des informations essentielles pour le codage spatial (O'Keefe, Nadel and O'Keefe, 1978). Ces « cellules de lieu » sont localisées au niveau de CA1 et sont activées par les neurones du cortex entorhinal (Brun *et al.*, 2002).

En résumé, l'hippocampe est une structure cérébrale profonde située dans le lobe temporal, dotée d'un réseau complexe d'afférences et d'efférences. Son architecture interne se divise en quatre régions principales : le gyrus denté (DG), la corne d'Ammon 1 (CA1), la corne d'Ammon 2 (CA2) et la corne d'Ammon 3 (CA3). Ces régions sont organisées en trois à cinq couches cellulaires, peuplées de neurones excitateurs, d'interneurones inhibiteurs et de cellules gliales. L'information neuronale, provenant du cortex entorhinal, circule à travers un circuit excitateur trisynaptique. Concernant sa fonction, l'hippocampe est crucial pour la mémoire déclarative à long terme, englobant à la fois la mémoire épisodique et la mémoire spatiale. Dans la partie suivante, nous explorerons en détail comment les neurones du circuit trisynaptique interagissent pour réguler la neurotransmission hippocampique.

B. La neurotransmission hippocampique

1) Transmission synaptique et équilibre ionique

Les cellules composant le système nerveux central sont principalement les neurones et les cellules gliales ou neuroglie. Les cellules gliales sont réparties entre la macroglie, regroupant les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules progénitrices des oligodendrocytes ainsi que les cellules de la microglie. Si le cerveau humain compte plus de 100 milliards de neurones, c'est au moins tout autant de cellules gliales qui le composent. La dichotomie entre les cellules neuronales et les cellules gliales repose sur des propriétés et des fonctions cellulaires spécifiques à chacune.

Les cellules gliales, dont le nom dérive du grec signifiant « glue », ont longtemps été considérées comme des cellules passives de second plan, dont le rôle était principalement d'apporter un soutien structural aux neurones. Cette vision a depuis évolué et on connaît aujourd'hui la diversité des fonctions dans lesquelles la neuroglie est impliquée. Les astrocytes, par exemple, sont nécessaires au maintien homéostatique et à la transmission synaptique. En collaboration avec les oligodendrocytes, qui assurent la conduction électrique en myélinisant les axones, les astrocytes participent à la survie neuronale et au support métabolique. Enfin la microglie est en charge de la surveillance active du microenvironnement neuronale et de l'immunité (Butt and Verkhratsky, 2018; Hemonnot-Girard *et al.*, 2021). Ces implications diverses sont toutes essentielles au fonctionnement neuronal physiologique et fondamentales pour assurer une transmission synaptique optimale (Verkhratsky *et al.*, 2014).

Concernant les neurones, ces cellules excitables constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux. S'il existe une grande diversité de neurones au niveau du cerveau, ils présentent toutefois une organisation morphologique similaire qui leur permettent de réceptionner, d'intégrer et de transmettre l'information neuronale. En effet, ils sont tous constitués d'un corps cellulaire, le soma, dans lequel siègent le noyau et la plupart des organites. De ce soma émergent deux types de prolongements, les dendrites, chargées de la réception et de l'intégration du message nerveux et enfin, l'axone, unique, dont la fonction est de transférer les signaux aux neurones périphériques. (Palay & Palade, 1955).

La transmission neuronale s'effectue au niveau des synapses, zone de contact entre l'axone du neurone présynaptique et le neurone postsynaptique. La transmission synaptique peut être de nature électrique ou chimique (Pereda, 2014). La synapse électrique se compose de jonctions communicantes à travers lesquelles le signal électrique est transmis directement aux neurones postsynaptiques. Ces synapses sont rares au niveau du système nerveux central.

A l'inverse, la synapse chimique est la plus largement répandue dans le cerveau et notamment dans l'hippocampe. Au niveau de ces synapses, les neurones communiquent par l'intermédiaire de neurotransmetteurs qui sont libérés par le

neurone présynaptique en réponse à son activation (Auerbach and Bennett, 1969). Une fois libéré, les neurotransmetteurs se fixent au niveau de récepteurs spécifiques postsynaptiques de nature ionotropique ou métabotropique.

Les récepteurs ionotropiques, qui seront décrits dans la suite du manuscrit, sont des canaux ioniques dont l'activation permet l'ouverture et le passage d'ions. Les espèces ioniques les plus courantes sont le Na⁺, le K⁺, le Cl⁻ et le Ca²⁺. Chacun de ces ions est distribué de façon spécifique au sein des compartiments extracellulaires et intracellulaires, contribuant ainsi à la création et au maintien d'une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique, essentiels pour la transmission neuronale (Figure 22).

	Milieu intracellulaire (mM)	Milieu extracellulaire mM)	Potentiel d'équilibre
Na ⁺	14	140	60 mV
K ⁺	140	5	-87mV
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1	120 mV
Cl ⁻	14	147	-61 mV

Figure 22: Concentration des espèces ioniques dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire et leur potentiel d'équilibre (adaptée de Kadala *et al.*, 2015 et ressources.unisciel.fr).

Cette différence de potentiel, appelée potentiel de membrane, est compris entre -60 mV et -70 mV. Chaque espèce ionique (X) possède un potentiel d'équilibre électrochimique (E_x) qui peut être défini par l'équation de Nernst :

$$E_x = -\left(\frac{RT}{zF}\right) \cdot \ln\left(\frac{[X]_i}{[X]_e}\right)$$

Dans cette équation on retrouve :

E_x : potentiel d'équilibre de l'ion X.

R : constante des gaz parfaits.

T : température absolue en degrés Kelvin.

z : valence de l'ion.

F : constante de Faraday.

[X]_i : concentration intracellulaire de l'ion X.

[X]_e : concentration extracellulaire de l'ion X.

La différence entre le potentiel de membrane et le potentiel d'équilibre de l'ion constitue la *driving force* ou gradient électrochimique. Cette donnée permet de prédire, pour un ion donné, son sens de déplacement à travers la membrane. Suite à l'ouverture des récepteurs ionotropiques, le passage d'ions va alors modifier le potentiel de membrane. Lorsque l'espèce ionique entrante possède un potentiel d'équilibre supérieur au potentiel de membrane (*driving force* négative) on parle de dépolarisation ou d'excitation du neurone. À l'inverse, lorsque l'espèce ionique entrante possède un potentiel d'équilibre inférieur au potentiel de membrane (*driving force* positive), on parle alors d'hyperpolarisation ou encore d'inhibition neuronale. L'excitation et l'inhibition de la transmission neuronale résultent de la libération de neurotransmetteurs spécifiques, majoritairement le glutamate et le GABA, libérés par l'activation de neurones spécialisés.

2) La transmission excitatrice et la plasticité synaptique

Le circuit trisynaptique par lequel transite la quasi-totalité de l'information neuronale traitée par l'hippocampe est un circuit excitateur glutamatergique. Les cellules qui le composent sont pour la plupart des neurones pyramidaux concentrés au niveau de la corne d'Ammon et des cellules granuleuses situées au niveau du Gyrus denté (Spencer and Bland, 2019). Le neurotransmetteur excitateur principal est le glutamate. Il est produit à partir de la glutamine initialement présente dans les astrocytes. Cette glutamine va être transférée aux neurones dans lesquels elle sera transformée en glutamate par la glutaminase (Walls *et al.*, 2015). Une fois libéré dans la fente synaptique, le glutamate s'associe à ses récepteurs postsynaptiques ionotropiques ou métabotropiques (Figure 23). Les récepteurs ionotropiques sont les récepteurs AMPA, NMDA et kaïnate. Ils sont formés de plusieurs sous-unités associées qui forment des pores dans la membrane plasmique et permettent le passage des ions dans l'espace intracellulaire à l'origine de l'excitation du neurone postsynaptique (Siddoway, Hou and Xia, 2011).

Les récepteurs NMDA (NMDAR) sont des tétramères constitués de deux paires d'homodimères, chacun formé par des sous-unités distinctes. La première sous-unité, GluN1, est essentielle à la fonctionnalité du récepteur et existe sous huit isoformes (1a à 4a et 1b à 4b).

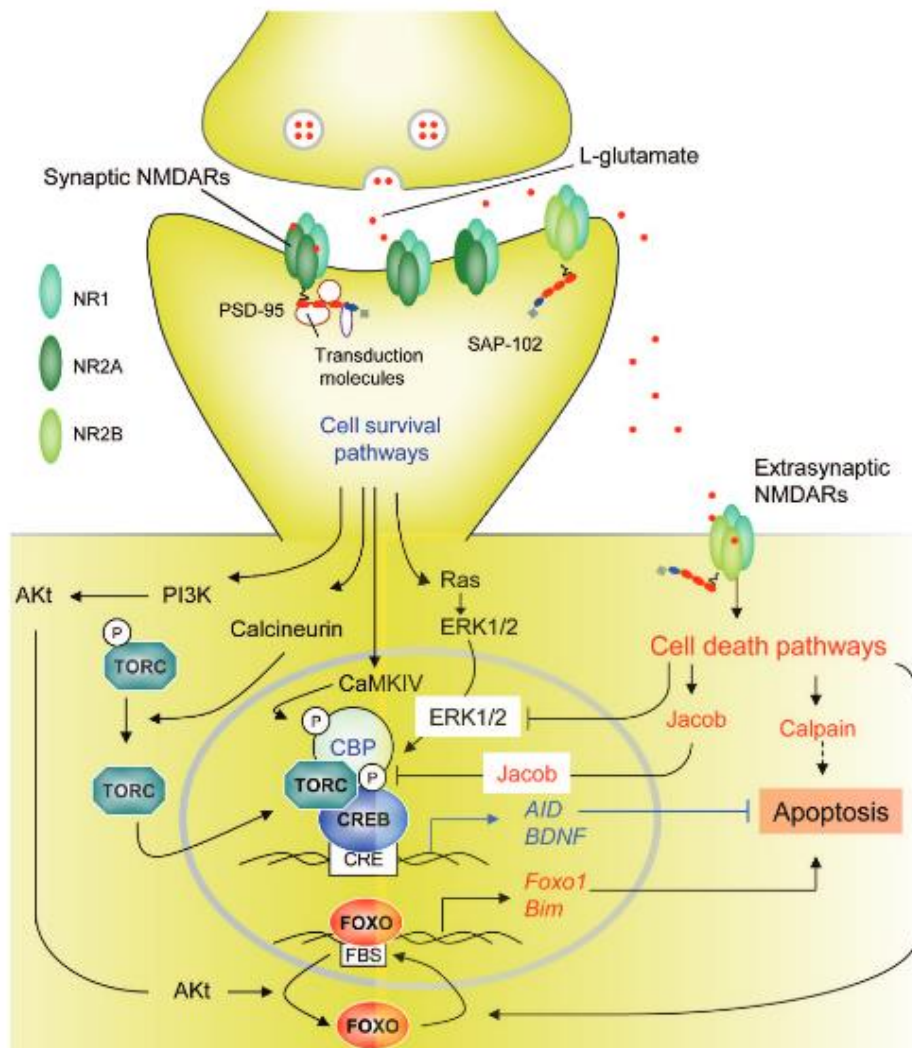


Figure 24 : Voies de transduction impliquant les récepteurs NMDA et favorisant la survie ou la mort neuronale (Benarroch, 2011). Lors de leur activation, les récepteurs NMDA synaptiques vont faire entrer du calcium dans les neurones ce qui va par la suite activé la Ca²⁺/calmoduline (CaM) kinase et ERK1/2 qui vont favoriser la survie neuronale. En revanche, l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques va conduire à l'activation des phosphatases Jacob et Calpaïne qui vont induire des processus pro-apoptotique et ainsi favoriser la mort cellulaire.

Cette sous-unité contient le site de fixation des co-agonistes du glutamate, la D-sérine et la glycine, indispensables à l'activation du récepteur. La sous-unité GluN2, quant à elle, possède quatre isoformes (GluN-2A, 2B, 2C et 2D), qui modulent les propriétés biophysiques et pharmacologiques du récepteur. Ces différentes

combinaisons influencent la sensibilité du récepteur aux ligands et sa cinétique, jouant un rôle clé dans la plasticité synaptique et le développement neuronal. C'est à son niveau que se situe le site de fixation du glutamate.

Enfin la dernière sous-unité GluN3 existe sous deux formes (GluN3A et GluN3B) et son rôle est encore peu connue. Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) se divisent en deux populations. On retrouve tout d'abord les NMDAR présents au niveau de la synapse (Figure 23 et 24). L'activation de ces récepteurs postsynaptiques est à l'origine de courant dépolarisant lent pouvant durer plusieurs centaines de millisecondes (Kleppe and Robinson, 1999). Ces NMDAR sont essentiels à de nombreuses fonctions neuronales notamment la survie cellulaire. En effet, des études ont montré que le flux de Ca^{2+} généré par leur activité permet l'activation du complexe Ca^{2+} /calmoduline (CaM) kinase et ERK1/2, qui favorisent la survie neuronale (Benarroch, 2011). Les NMDAR postsynaptiques jouent également un rôle central dans les processus de plasticité synaptique.

La plasticité synaptique désigne les mécanismes moléculaires par lesquels la synapse peut ajuster son efficacité de transmission, soit en la renforçant, soit en l'affaiblissant. Ces effets opposés mais complémentaires sont essentiels aux processus de mémorisation et d'apprentissage. La plasticité synaptique repose sur la capacité des neurones à moduler l'expression de leur récepteurs postsynaptiques. Ainsi, pour une même activation, l'insertion de nouveaux récepteurs conduira à l'augmentation de la réponse neuronale, ce phénomène est appelé potentialisation. A l'inverse, leur internalisation conduira à une diminution de la réponse neuronale, on parle alors de dépression. La modification durable de la quantité de récepteurs met en jeu les AMPAR et les NMDAR.

Le terme de plasticité fait échos au remodelage structurel de la synapse dont la taille peut augmenter ou diminuer. La potentialisation synaptique est généralement induite par une activation intense du neurone postsynaptique. L'influx massif d'ions provoque alors une dépolarisation suffisante pour expulser l'ions Mg^{2+} présent dans le canal des NMDAR, permettant ainsi le passage des ions Na^+ et Ca^{2+} (Gielen, 2010). L'entrée de Ca^{2+} déclenche l'activation de kinases, entraînant le recrutement de nouveaux récepteurs AMPA qui vont pouvoir s'insérer dans la membrane synaptique. Cette insertion entraîne l'élargissement de la synapse et l'augmentation de l'efficacité de la transmission neuronale (Figure 25).

À l'inverse de la potentialisation, la dépression se produit lorsque l'activité synaptique est très faible et se traduit par l'activation de phosphatases conduisant à l'internalisation des AMPAR. Ce processus aboutit à la diminution de la synapse et à la réduction de la transmission neuronale (Bear and Malenka, 1994; Malenka, 1994). Si ces modifications persistent dans le temps, on parle de potentialisation à long terme (LTP) ou de dépression à long terme (LTD) (Figure 25). Il est possible d'induire ces phénomènes *in vitro* au moyen de protocoles électrophysiologiques spécifiques afin d'étudier les conséquences du peptide A β et de l'accumulation de glutamate sur la plasticité synaptique.

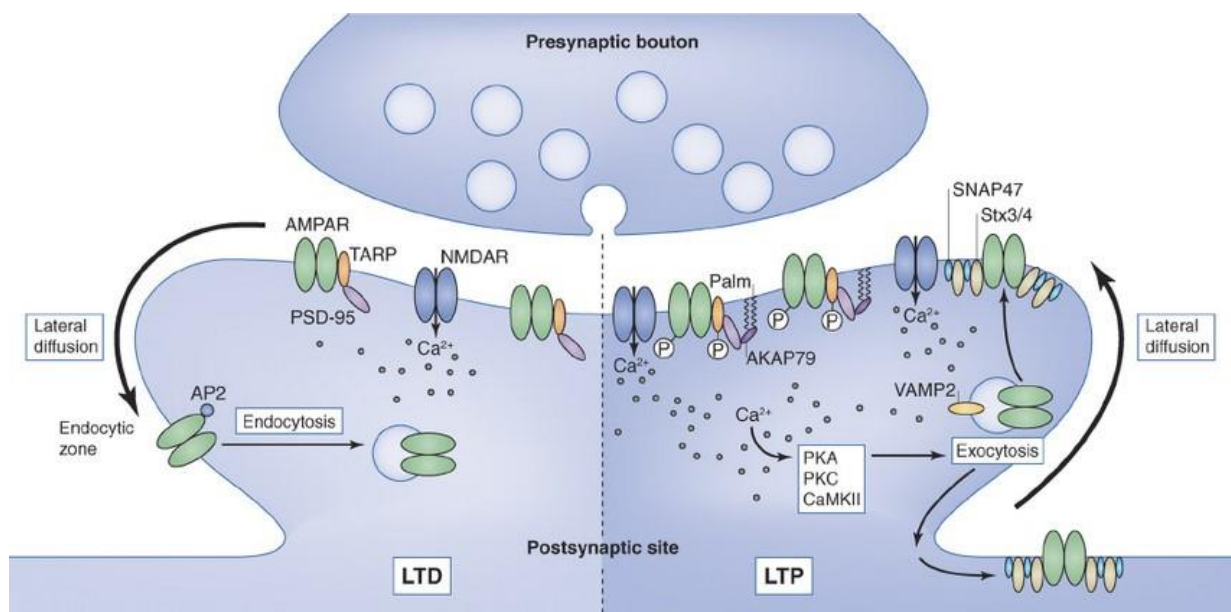


Figure 25 : Processus de plasticité synaptique à long terme (Vitureira & Goda, 2013). Lors d'une activation forte et prolongée du neurone postsynaptique, un influx de Ca^{2+} va transiter à travers les NMDAR. Ce Ca^{2+} va à son tour activer des kinases qui permettront l'insertion de nouveaux AMPAR au niveau de la membrane plasmique. Cette insertion est à l'origine de la LTP (à droite). À l'opposé, une activation faible et prolongée va induire l'internalisation des AMPAR qui est responsable de la LTD. Ces deux mécanismes cellulaires complémentaires sont au cœur des processus de mémoire et d'apprentissage.

La deuxième population de récepteurs NMDA sont localisés au niveau extra-synaptiques. De façon intéressante, ces récepteurs ont un rôle antagoniste aux premiers puisque l'entrée de Calcium qu'ils génèrent est à l'origine de l'activation de phosphatases impliquées dans divers voies métaboliques conduisant à la perte synaptique et au processus d'excitotoxicité neuronale (Figures 23 et 24) (Benarroch, 2011).

Les récepteurs à la kaïnate constituent les troisièmes et derniers récepteurs ionotropiques au glutamate. Ils s'organisent en tétramères et sont perméables aux ions Na^+ et K^+ . Cinq sous-unités ont été répertoriées (GLUK1 à GluK5) (Figure 23). Ces récepteurs peuvent être localisés au niveau pré ou postsynaptique. Bien que leur rôle dans la neurotransmission soit encore peu exploré, ils sembleraient impliqués dans la régulation de l'excitabilité (Ruiz *et al.*, 2005). Des recherches effectuées sur des tranches d'hippocampes de rats, ont également mis en évidence leur implication dans la genèse de courant dépolarisant lent de plus d'une centaine de millisecondes à la suite de stimulations délivrées à de hautes fréquences (100 Hz) (Vignes and Collingridge, 1997).

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) possèdent sept domaines transmembranaires ainsi qu'un domaine intracellulaire (Figure 23). Ils font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Lorsqu'ils se lient au glutamate, ces récepteurs subissent un changement de conformation, ce qui active la protéine G à laquelle ils sont associés. Cette activation entraîne à son tour l'activation ou l'inhibition de divers effecteurs cellulaires.

Les mGluR du groupe I (mGluR1 à mGluR5) sont principalement localisés au niveau postsynaptique et activent la phospholipase C, ce qui entraîne une augmentation du calcium cytosolique. Les autres mGluR, au nombre de six, inhibent l'adénylate cyclase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'AMP cyclique (Nakanishi, 1994; Anwyl, 1999). Bien que les récepteurs métabotropiques ne soient pas directement impliqués dans la transmission synaptique en tant que tels, car leur activation ne provoque pas de dépolarisation, ils jouent un rôle crucial dans les processus de plasticité synaptique (Balschun *et al.*, 1999; Anwyl, 2009).

3) La transmission inhibitrice

La transmission inhibitrice met en jeu l'acide γ -aminobutyrique ou GABA qui représente le principal neurotransmetteur mis en jeu. Le GABA est libéré par les interneurons dont plus d'une vingtaine de sous-catégories sont présentes au niveau de l'hippocampe. Tout comme le glutamate, le GABA est produit à partir de la glutamine astrocytaire. Dans les interneurons, la glutamine va être transformée en

glutamate avant d'être convertie en GABA par la glutamate-décarboxylase (Walls *et al.*, 2015). Le GABA peut se lier à trois types de récepteurs postsynaptiques : les récepteurs ionotropique GABA_A et GABA_C et les récepteurs GABA_B métabotropiques (Figure 26).

Les récepteurs GABA_A sont les plus abondants. Ils sont composés de cinq sous-unités qui forment un canal ionique intrinsèque (Sieghart *et al.*, 1999). Parmi les 19 sous-unités identifiées (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π et ρ 1-3), α 1, β 2 et γ 2 sont les plus exprimées au niveau de l'hippocampe (Olsen and Sieghart, 2009). La grande diversité de sous-unités permet la constitution d'un large panel de récepteurs aux propriétés pharmacologiques diverses toujours à l'étude actuellement.

Les récepteurs GABA_A sont le plus couramment constitués de la manière suivante : deux sous-unités α , deux sous-unités β et une dernière sous-unité γ . Le canal ionique formé est perméable aux ions Cl⁻ et dans une moindre mesure aux ions bicarbonates. Les récepteurs GABA_A peuvent être synaptiques ou extra-synaptiques. Dans le SNC, le passage d'ions à travers les GABA_A synaptique génère des courants hyperpolarisants inhibiteurs rapides et phasiques (Thompson and Stephenson, 1994). Les GABA_A, extrasynaptiques sont moins sensibles au GABA et semblent impliqués dans une forme de communication neuronale plus lente appelée inhibition tonique (Reddy, 2018).

Les récepteurs GABA_C sont organisés en pentamères formés d'une seule sous-unité ρ dont trois isoformes ont été répertoriées (Bormann, 2000). Ils sont surtout localisés au niveau de la rétine chez les adultes mais peuvent également être retrouvés dans l'hippocampe et l'amygdale (Delaney and Sah, 2001; Lukasiewicz *et al.*, 2004; Alakuijala and Pasternack, 2006). Ces récepteurs semblent être uniquement perméables aux ions Cl⁻. Dans l'hippocampe, ils sont activés lors de stimulation intense. L'absence d'activation par une stimulation faible laisse présager une localisation extrasynaptique.

Les récepteurs métabotropiques GABA_B sont des heterodimères composés de deux sous-unités GB1 et GB2. Ces récepteurs sont exprimés dans l'ensemble du SNC à la fois au niveau des sites presynaptiques et postsynaptiques (Sloviter, 1999).

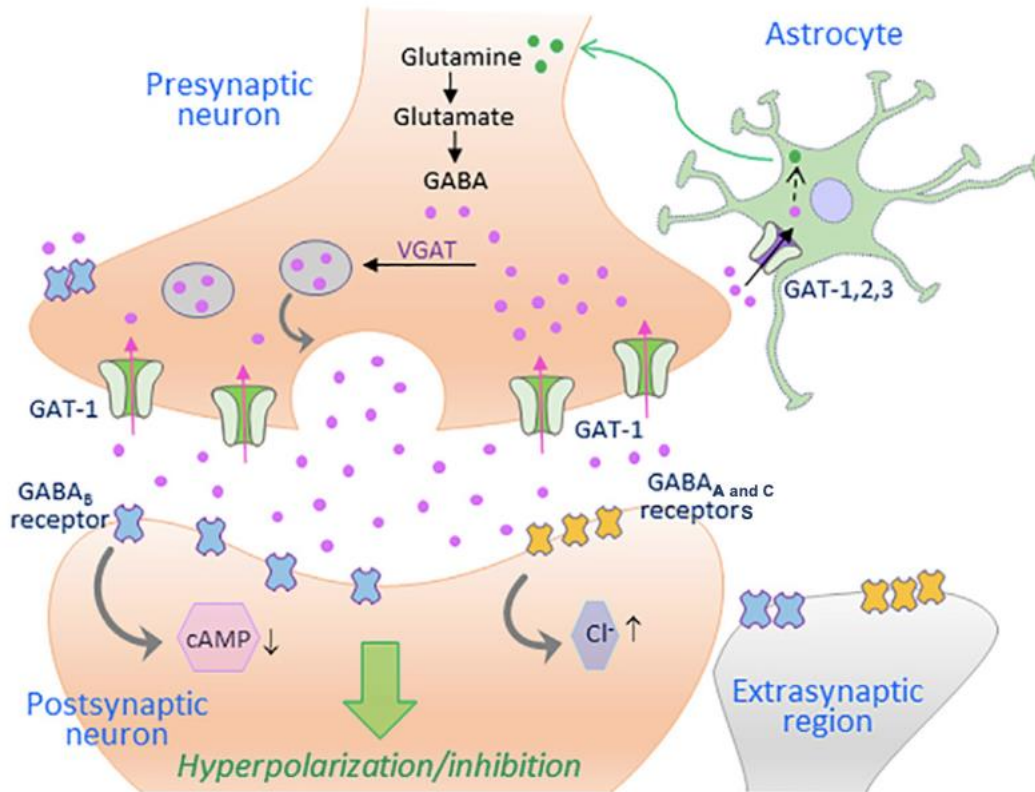


Figure 26: Synapse GABAergique inhibitrice (adaptée de Fischer *et al.*, 2022). Les récepteurs GABAergiques sont regroupés en deux catégories. On distingue ainsi les récepteurs canaux ionotropiques GABA_A qui permettent le passage du Cl⁻ et des ions bicarbonate et le récepteur GABA_C qui est perméable au Cl⁻ uniquement. La deuxième catégorie correspond aux récepteurs métabotropiques GABA_B couplés aux protéines G α_i et G α_o .

Les GABA_B sont des RCPG couplés aux protéines G α_i et G α_o . L'activation des récepteurs postsynaptiques réduit l'excitabilité des neurones en inhibant les canaux calciques voltage-dépendants et en activant les GIRK (*G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels*) (Misgeld, Bijak and Jarolimek, 1995; Chalifoux and Carter, 2011). Les GABA_B présynaptiques peuvent également inhiber les canaux calciques voltage-dépendants ainsi que l'adénylate cyclase (Nishikawa, Hirouchi and Kuriyama, 1997). En plus d'influencer la transmission inhibitrice, l'ensemble des GABA_B pré et postsynaptiques sont également impliqués dans la régulation de la potentialisation à long terme (LTP) (Chalifoux and Carter, 2010).

4) La balance excitation/inhibition et homéostasie du Cl⁻

La régulation de la transmission est cruciale pour maintenir une activité une basale suffisante et efficace. Cette régulation s'opère à travers le maintien d'un équilibre dynamique entre les neurotransmissions excitatrice et inhibitrice. Dans le circuit trisynaptique hippocampique, les signaux excitateurs provenant des neurones pyramidaux sont continuellement modulés par l'activité inhibitrice résultant d'une coordination fine et d'une synchronisation complexe des interneurons. En 2001, le groupe de Megías *et al.* ont tenté d'illustrer ce phénomène biologique en quantifiant le nombre de connexions excitatrices et inhibitrices que pouvait recevoir une cellule pyramidale. Chez le rat adulte, il a été estimé qu'un seul neurone pyramidal de la région CA1 pouvait recevoir approximativement 30 000 afférences excitatrices et 1700 afférences inhibitrices, principalement localisées dans le stratum pyramidale (40%) (Megías *et al.*, 2001).

Avant la mise en place d'un réseau neuronal complexe et dense mettant en jeu un système antagoniste excitation/inhibition (E/I), le circuit neuronal est d'abord uniquement excitateur. Au cours des stades précoces du développement, les synapses du SNC sont uniquement GABAergiques. La répartition des espèces ioniques à l'intérieur du compartiment neuronal diffère de celle de l'adulte, notamment en raison de l'ions Cl⁻ qui est alors plus concentré à l'intérieur du neurone. L'activation des récepteurs GABAergiques génère alors une sortie des ions Cl⁻ se traduisant par une dépolarisation (Ben-Ari, 2002). La conversion des synapses GABAergiques excitatrices en synapses inhibitrices survient au moment de la naissance (Tyzio *et al.*, 2006). Ce *shift* GABAergique est sous le contrôle de co-transporteurs appartenant à la famille des SLC (*Solute Carrier Family*). Cette famille regroupe 52 sous-catégories dont celle des co-transporteurs électroneutres cation-chlore (CCCs) composée de 7 membres : deux **NKCCs** (co-transporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻, NKCC1 et NKCC2), quatre **KCCs** (co-transporteur K⁺/Cl⁻, KCC1 à KCC4) et un **NCC** (co-transporteur Na⁺/Cl⁻) (Chew *et al.*, 2019).

Parmi ces co-transporteurs, ce sont les formes NKCC1 et KCC2, principalement exprimées dans les neurones, qui sont impliquées dans le *shift* GABAergique (Figure 27) (Ben-Ari *et al.*, 2012; Kaila *et al.*, 2014).

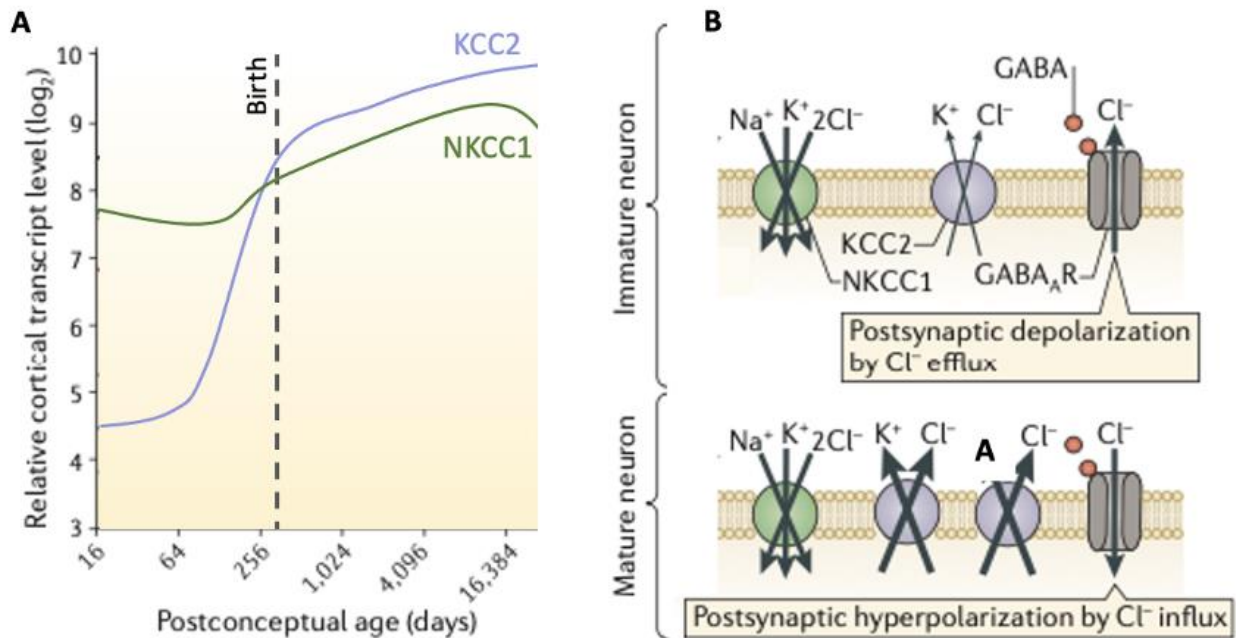


Figure 27: Profils d'expression et fonctions des NKCC1 et KCC2 au cours du développement (adaptée de Kaila *et al.*, 2014). Sur la figure A sont représentés l'expression au cours du temps des ARN messagers des NKCC1 (vert) et KCC2 (violet) dans le néocortex humain. La figure B représente les fonctions des co-transporteurs en fonction de la maturité des neurones. Dans les neurones immatures, le NKCC1 est davantage exprimé permettant au chlore de s'accumuler dans l'espace intracellulaire. Dans les neurones matures, l'augmentation de l'expression des KCC2 induit une sortie massive de chlore à l'origine du rôle inhibiteur du GABA.

Au cours du développement embryonnaire, c'est le NKCC1 qui est le plus largement exprimé à la surface des neurones (Kanaka *et al.*, 2001). La fonction du NKCC1 est de faire entrer de chlore à l'intérieur des cellules. Il est donc à l'origine du rôle dépolarisant du GABA dans les neurones immatures (Yamada *et al.*, 2004). À l'inverse, le KCC2, dont l'expression deviendra majoritaire dans les neurones matures, constitue le principal co-transporteur permettant l'extrusion du chlore neuronal. C'est grâce à l'augmentation progressive de son expression que le chlore va s'accumuler à l'extérieur des neurones, conférant ainsi un rôle inhibiteur au GABA (Cherubini, Gaiarsa and Ben-Aft, 1991; Rivera *et al.*, 1999). Le rôle central qu'occupent les KCC2 dans la régulation de l'homéostasie du chlore, et plus généralement dans le contrôle de l'activité inhibitrice hippocampique, font aujourd'hui de ce co-transporteur un sujet

d'étude particulièrement intéressant. Ces recherches sont importantes pour comprendre les mécanismes à l'origine des pathologies neurologiques dans lesquelles l'équilibre entre les transmissions excitatrice et inhibitrice (E/I) est altéré.

C. Le co-transporteur KCC2

1) Structure du KCC2 et profil d'expression

Le co-transporteur KCC2 a été identifié dans les années 1990s par Payne *et al.* (1996) au cours d'études génomiques sur le cerveau de rat. Ce co-transporteur est une glycoprotéine transmembranaire de 140 kDa constituée de 12 domaines transmembranaires intercalés entre des extrémités intracellulaires N-terminale (acides aminés 1 à 103) et C-terminale (500 derniers acides aminés) (Payne, Stevenson and Donaldson, 1996). Cette protéine se distingue par la présence d'une boucle extracellulaire, située entre le 5^{ème} et 6^{ème} domaines transmembranaires, contenant les six domaines de N-glycosylation ainsi que des résidus cystéines essentiels au transport des ionique (Figure 28) (Agez *et al.*, 2017; Côme *et al.*, 2019).

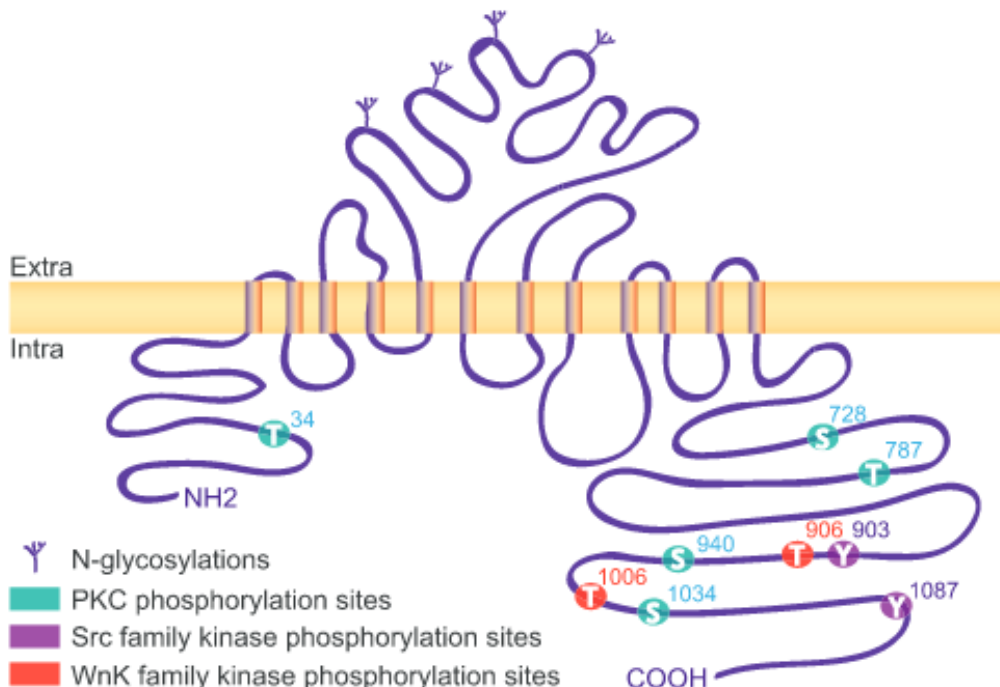


Figure 28 : Structure du KCC2 humain (Côme *et al.*, 2019). Le co-transporteur KCC2 est une glycoprotéine de 140 kDa avec une topologie prédite de 12 domaines transmembranaires et une boucle extracellulaire entre les domaines 5 et 6 contenant les sites de N-glycosylations et les résidus cystéines. Le domaine N-terminal et C-terminal sont intracellulaires.

Les structures tertiaires et quaternaires du KCC2 ne sont pas encore complètement caractérisées, mais il est connu que ce co-transporteur peut former des structures multimériques (dimères, trimères et tétramères) en se liant avec lui-même ou avec d'autres protéines de la famille des co-transporteurs Cation/Chlore (CCCs) via des ponts disulfures (Blaesse *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2007; Uvarov *et al.*, 2009). Chez l'Homme, le gène KCC2 (SLC12A5) produit deux isoformes, KCC2a et KCC2b, qui peuvent interagir entre elles (Uvarov *et al.*, 2007). Ces isoformes diffèrent par la longueur de leur région N-terminale : KCC2a possède une région N-terminale plus longue de 40 acides aminés, incluant une séquence *Ste20-related proline-alanine-rich kinase* (SPAK). Dans le système nerveux central (SNC), l'expression de KCC2 est spécifique aux neurones, en raison de la présence d'un site de fixation pour le facteur REST (*RE1-silencing transcription factor*) dans l'intron 1 (Karadsheh and Delpire, 2001).

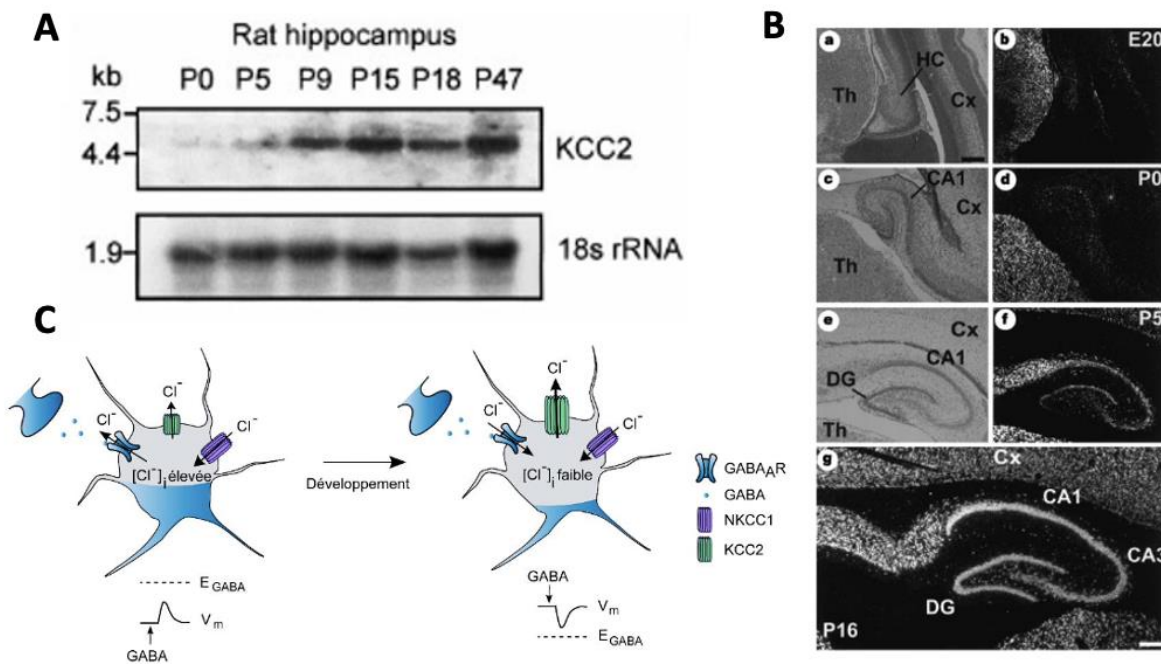


Figure 29: Expression d KCC2 au cours du développement postnatal dans le cerveau de rat (adaptée de Rivera *et al.*, 1999 et Denneger.,2022). A, Analyse par Northern blot de l'ARNm total isolé de l'hippocampe de rat à différents jours postnatals montre une augmentation prononcée de l'ARNm de KCC2 avec une forte augmentation vers P5. B, Expression de l'ARNm KCC2 dans l'hippocampe de rat en développement révélée par hybridation in situ. a, b, à E20, le marquage de l'ARNm KCC2 est observé dans le thalamus (Th). c, d, A P0, un faible marquage de l'ARNm est observé dans le *stratum pyramidale* et le *subiculum* de l'hippocampe. e, f, A P5, un marquage plus intense est observé dans les mêmes régions qu'à P0, avec un marquage supplémentaire du gyrus denté (DG) et du néocortex. g, Une nouvelle augmentation marquée de l'intensité du marquage est observée à P16 dans l'hippocampe et le néocortex. Barres d'échelle, 200 mm (a-f), 400 mm (g). C, Au cours du développement, l'expression des KC2 augmente et induit le changement de polarité de la transmission GABAergique.

Des études réalisées chez le rat montrent qu'au cours du développement postnatal, le co-transporteur est d'abord détecté dans les neurones post mitotiques de la moelle épinière et du tronc cérébrale avant d'être exprimé dans le reste des structures cérébrales. S'ils forment tout deux des co-transporteurs fonctionnels, le profil d'expression des deux isoformes est néanmoins différent.

En effet, KCC2b est exprimé dans l'ensemble du cerveau avec une expression fortement augmentée pendant le développement, contrairement au KCC2a dont l'expression reste constante mais faible dans certaines régions du cerveau notamment l'hippocampe, le cortex, le cervelet et le thalamus ([Figure 29](#)) (Rivera *et al.*, 1999; Markkanen *et al.*, 2014). Ces observations suggèrent que KCC2b est l'isoforme responsable du changement des réponses GABAergique dépolarisantes en réponse hyperpolarisantes.

Chez l'Homme, l'expression des KCC2 augmente *in utero* à partir de la 25^{ème} semaine post-conception. Cette expression serait maximal après la naissance et resterait stable à l'âge adulte (Sedmak *et al.*, 2016). Au niveau subcellulaire, KCC2 présente une expression diffuse au niveau des membranes somato-dendritiques. En revanche, il est totalement absent de l'axone. Il peut également former des clusters à proximité des synapses glutamatergiques et GABAergiques ([Figure 30](#)) (Chamma *et al.*, 2012).

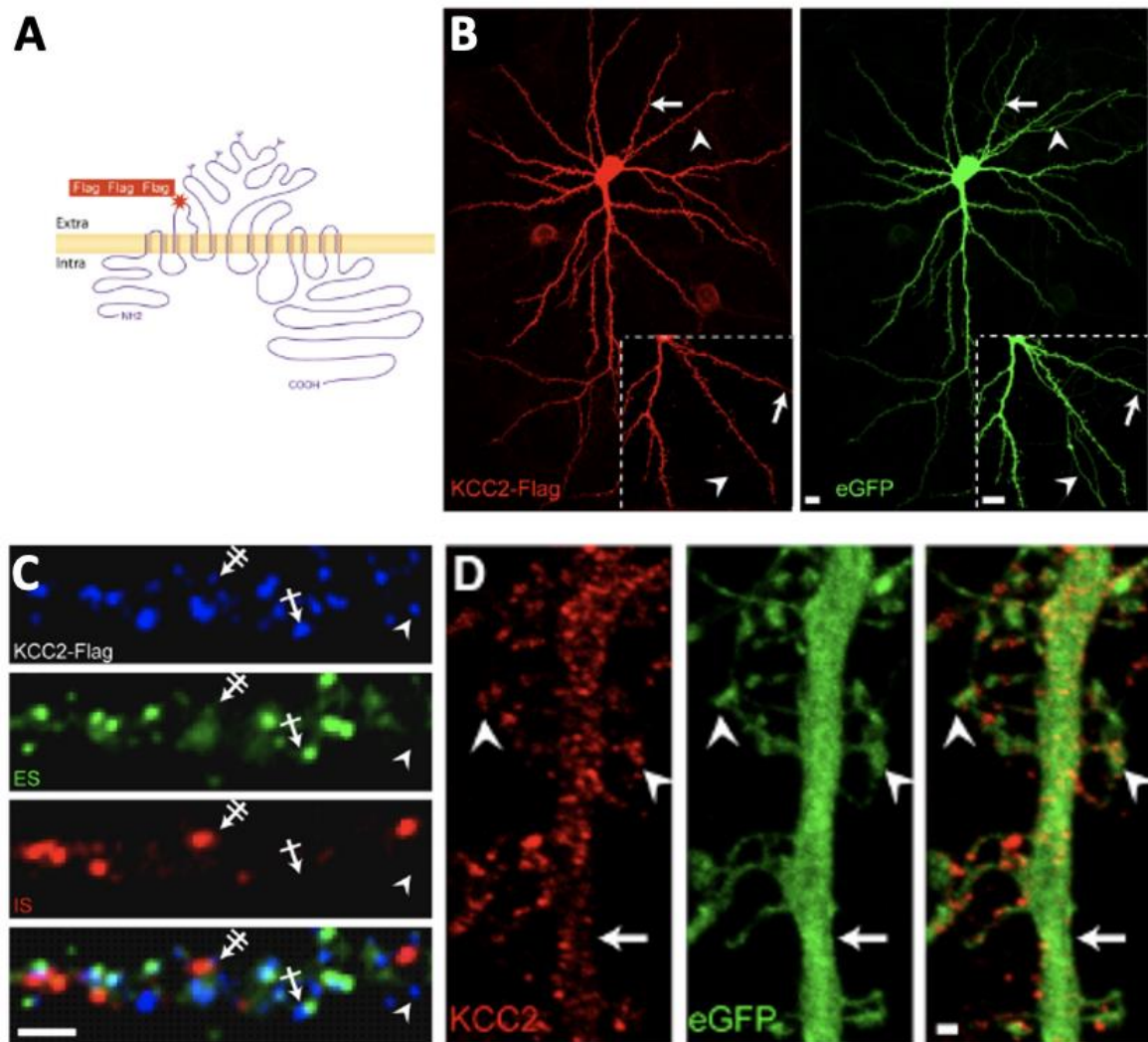


Figure 30 : Localisation neuronale du KCC2 (adaptée de Chamma *et al.* 2012) A, Schéma de la séquence taguée du KCC2. B, expression du KCC2-tagué (rouge) dans des neurones hippocampiques perméabilisés (DIV 22) et transfectés avec la eGFP (vert). C, expression des clusters membranaires de KCC2 (bleu) au niveau de synapses excitatrices (homer1c-GFP : vert) et inhibitrices (f-mRFP: rouge), barre d'échelle 2 μ m. D, localisation des KCC2 tagués (rouge) au niveau de l'arborisation dendritique (vert), barre d'échelle 1 μ m.

2) Fonctions du KCC2

Nous avons précédemment évoqué le rôle fondamental que joue le KCC2 dans la régulation de l'homéostasie du chlore et le *shift* de la transmission GABAergique, processus mettant en jeu les KCC2b principalement. Ces fonctions sont essentielles au sein des circuits neuronaux pour le développement et le maintien de l'équilibre entre excitation et inhibition (E/I). En conséquence, les KCC2 font l'objet de nombreuses

recherches, mettant en lumière de nouveaux processus physiologiques auxquels ces co-transporteurs pourraient être liés.

Les premières études sur des souris ont impliqué un Knock-Out des deux isoformes du KCC2. Ces souris sont décédées peu après la naissance en raison de graves déficiences respiratoires et musculaires. Fait intéressant, les souris ne possédant que l'isoforme KCC2a ont présenté des crises d'épilepsie sévères et n'ont survécu que deux semaines. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel du KCC2a dans le développement de la moelle épinière et du tronc cérébral (Uvarov *et al.*, 2007; Dubois *et al.*, 2018).

a) Régulation de l'osmolarité

En plus de leur rôle de co-transporteurs ioniques, les KCC2 jouent un rôle crucial dans la régulation de l'osmolarité neuronale. Comme pour la plupart des co-transporteurs membranaires, les flux ioniques générés par les KCC2 sont accompagnés de mouvements d'eau importants, permettant à de nombreuses cellules de moduler leur osmolarité. La régulation osmotique est d'ailleurs la première fonction découverte concernant les KCCs qui ont été identifiés pour la première fois dans les cellules épithéliales et les hématies (Lauf and Theg, 1980). Cette régulation est particulièrement essentielle lors d'une activité neuronale intense, où les échanges ioniques entraînent des flux d'eau significatifs provoquant un gonflement cellulaire.

Étant donné que les neurones ne possèdent pas d'aquaporines, les transporteurs membranaires, tels que les KCC2, sont nécessaires pour freiner l'entrée excessive de molécules d'eau. L'implication des KCC2 dans ce processus a été démontrée par Jourdain *et al.* (2011), qui ont observé, dans des cultures de neurones corticaux de souris, que les KCC2 étaient indispensables à la réduction du volume neuronal après activation par une application de glutamate (Jourdain *et al.*, 2011). Ces résultats ont été corroborés la même année par les travaux de Pellegrino et son équipe (Pellegrino *et al.*, 2011).

b) Régulation du développement des épines dendritiques

Au cours du développement postnatal et chez le rat adulte, la présence des KCC2 semble fortement corrélée, dans le temps et l'espace, avec la mise en place des synapses glutamatergiques. Les analyses microscopiques et structurales menées par Gulyas *et al.* (2001) montrent d'ailleurs une expression des KCC2 préférentiellement localisée à proximité des synapses glutamatergiques (Gulyás *et al.*, 2001). Ces observations ont initialement surpris les chercheurs, étant donné le rôle bien connu des KCC2 dans le *shift* GABAergique. Gulyás et son équipe ont d'abord émis l'hypothèse que cette localisation particulière permettrait aux KCC2 de réguler la pression osmotique induite par l'activité glutamatergique et les flux ioniques associés. Cependant, cette hypothèse a été infirmée en 2007 lorsque Li *et al.* (2007) ont observé des épines dendritiques présentant des morphologies anormales chez des souris KO pour le gène KCC2. De manière intéressante, cet effet semblait indépendant de la fonction de co-transporteur ionique des KCC2 (Li *et al.*, 2007).

Ce phénotype surprenant a mis en lumière le rôle crucial du co-transporteur dans la formation et le maintien des synapses excitatrice. La question s'est alors posée de savoir quels mécanismes sous-tendaient ses anomalies dendritiques. Par des expériences de co-immunoprécipitation, les chercheurs ont identifié la protéine 4.1N, une protéine de liaison spectrine/actine, comme partenaire du KCC2 (Baines, Lu and Bennett, 2014). L'interaction s'établit entre le domaine C-terminal du KCC2 et le domaine FERM de 4.1N, et la perturbation de cette interaction suffit à reproduire le phénotype observé chez les souris KO.

Le rôle structurel des KCC2 dans la morphogenèse des épines dendritiques a été confirmé par d'autres études, notamment par Fiumelli *et al.* (2013), qui ont montré qu'une surexpression des KCC2 dans des neurones pyramidaux corticaux de souris entraînait une augmentation de la densité des épines dendritiques, accompagnée d'une activité excitatrice exacerbée (Fiumelli *et al.*, 2013).

En résumé, les co-transporteurs KCC2 jouent un rôle essentiel dans la régulation et le maintien de la neurotransmission. Leur fonction principale consiste à réguler l'homéostasie du chlore, un élément clé de la transmission GABAergique et de

l'équilibre excitation/inhibition (E/I). Bien que cette fonction soit liée à leur activité de transport ionique, d'autres processus synaptiques, tels que la morphogenèse des épines dendritiques et la régulation osmotique, dépendent des interactions protéiques du KCC2, indépendamment de son rôle de transporteur.

3) Régulation du KCC2

a) Transport vésiculaire et dégradation du co-transporteur

Le trafic cellulaire des protéines membranaires est un élément crucial pour le contrôle de leur activité. Dans le cas des KCC2, l'adressage et la stabilisation des co-transporteurs ont été étudiés à l'aide de diverses techniques, dont l'utilisation de protéines couplées à des fluorochromes sensibles au pH.

Grâce à cette approche appliquée à des cultures de neurones hippocampiques mutés, Friedel *et al.* (2017) ont mis en lumière le rôle du domaine N-terminal dans l'adressage membranaire du co-transporteur, ainsi que l'importance du domaine C-terminal pour sa stabilisation (Friedel *et al.*, 2017).

D'autres travaux ont permis d'identifier différents acteurs impliqués dans le transport vésiculaire et l'exocytose membranaire des KCC2. Parmi les protéines identifiées, le facteur de croissance B2 (TGF- β 2) joue un rôle à la fois dans le trafic et l'expression membranaire du KCC2, ainsi que dans le contrôle de son activité. TGF- β 2 favoriserait notamment l'interaction de KCC2 avec la protéine de liaison Ras 11, essentielle à la translocation du co-transporteur vers la membrane (Roussa *et al.*, 2016).

Les KCC2 sont des protéines dynamiques, qui, à la suite de leur intégration à la membrane plasmique, subissent plusieurs cycles d'endocytose/exocytose avant d'être définitivement dégradées. Cette dynamique a été mise en évidence par de nombreux travaux permettant d'estimer la durée de vie du KCC2 à moins de 4h avec un renouvellement membranaire compris entre 20 et 30 minutes (Rivera *et al.*, 2004; Lee, Jurd and Moss, 2010; Puskarjov *et al.*, 2012; Kahle *et al.*, 2013).

Concernant l'endocytose des KCC2, plusieurs mécanismes ont été proposés notamment l'endocytose clathrine-dépendante. Les expériences menées par Macia *et al.* (2006) ont en effet suggéré ce mécanisme à la suite de résultats montrant que l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante génère une augmentation significative de l'expression membranaire et totale des KCC2 (Macia *et al.*, 2006). Ces résultats ont par la suite été confirmés par Zhao *et al.* (2008) suite à l'observation de l'interaction *in vivo* entre les KCC2 et la protéine de liaison à la clathrine AP-2 dans le cerveau de souris adultes (Zhao *et al.*, 2008).

La dégradation des KCC2 est un mécanisme qui peut être initié par plusieurs voies de signalisation. La première correspond à la voie lysosomale, un processus nécessitant la phosphorylation du co-transporteur et qui est principalement déclenché à la suite de l'activation des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (Lee, Jurd and Moss, 2010). Le second mécanisme de dégradation fait intervenir le protéasome et repose sur l'ubiquitination des KCC2 (G. Chen *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2021). Enfin, la dernière voie de dégradation est liée aux récepteurs NMDA, et plus précisément à l'influx de calcium qu'ils génèrent lors de leur activation. Ce calcium intracellulaire active divers effecteurs, dont la calpaïne, responsable du clivage du domaine C-terminal stabilisateur des KCC2 (Puskarjov *et al.*, 2012; Chamma *et al.*, 2013).

b) Régulations endogènes

Oligomérisation

Suite à leur synthèse au niveau du SNC, les KCC2 peuvent s'oligomériser pour former des complexes multimériques identifiés pour la plupart des co-transporteurs électroneutres cation-chlore (CCCs) (Blaesse *et al.*, 2006; Simard *et al.*, 2007). La répartition entre les formes monomériques, dimériques et oligomériques n'est pas encore bien établie et reste un sujet de débat. Néanmoins, il semblerait que dans les neurones, les KCC2 soient le plus couramment retrouvés sous forme d'hétérodimères (KCC2a/KCC2b ou KCC2/KCC4) (Uvarov *et al.*, 2009; Agez *et al.*, 2017; Smalley *et al.*, 2020). D'après les expériences de Watanabe *et al.* (2009) menées sur des cultures primaires de neurones hippocampiques, cette organisation dimérique dépend du domaine C-terminal des KCC2 (Watanabe *et al.*, 2009). En particulier, une mutation

de la tyrosine 1087 dans cette région entraîne une réduction significative de l'oligomérisation des co-transporteurs.

La relation entre la fonction des KCC2 et leur état d'oligomérisation est encore en cours d'exploration, mais certaines études suggèrent que la formation d'oligomères pourrait améliorer le transport ionique. Par exemple, Ivakine et son équipe ont identifié une protéine partenaire des KCC2, *la neuropilin and tolloid like-2* (Neto2), qui s'associe préférentiellement aux formes oligomériques du transporteur, augmentant ainsi l'extrusion du chlore dans les neurones hippocampiques de souris (Ivakine *et al.*, 2013). Ces résultats ont été confirmés par des analyses d'immunofluorescences quantitatives réalisées sur des cultures de neurones d'hippocampe de souris. Dans ces cellules, l'interaction des oligomères KCC2 avec Neto2 ou avec la sous unité GluK2 des récepteurs kaïnates entraînait une augmentation du transport de chlore. Dans le cas de GluK2, cette interaction était également associée à une augmentation de l'expression membranaire des KCC2 (Pressey *et al.*, 2017).

Une autre protéine appartenant à la famille des CCCs, la CIP1 (*CCC-interacting protéine 1*) identifiée lors d'expériences menée sur des cellules HEK-293, semble elle aussi améliorer la fonction des KCC2 (Wenz *et al.*, 2009).

Phosphorylation

De nombreux sites de phosphorylations ont été identifiés dans les séquences N-terminale et C-terminale des KCC2 (Figure 31). Certaines de ces phosphorylations favorisent la fonction, la stabilisation ou l'expression membranaire des KCC2 (phosphorylations activatrices), tandis que d'autres sont responsables de l'endocytose et de la dégradation du co-transporteur (phosphorylations inhibitrices).

Parmi les phosphorylations favorables, la phosphorylation de la sérine 940 (S940), située au niveau du domaine C-terminal, a été largement étudiée. Réalisée par la protéine kinase C (PKC), cette modification favorise à la fois la stabilisation et l'activité fonctionnelle des KCC2 dans les cellules neuronales hippocampiques (Lee *et al.*, 2007; Chamma *et al.*, 2012).

Des mutations réalisées dans des cellules HEK293 ou chez des souris génétiquement modifiées ont permis de mettre en évidence une autre phosphorylation ayant des effets similaires. Il s'agit de la Sérine 937 qui permet, elle aussi, d'augmenter le transport ionique des KCC2 (Radulovic *et al.*, 2023).

En ce qui concerne les phosphorylations inhibitrices, celles-ci semblent davantage concerner les résidus de thréonine, notamment la thréonine 906 (T906) et la thréonine 1007 (T1007). La phosphorylation de ces résidus conduit à la déstabilisation des KCC2 membranaires présents dans les neurones matures (Heubl *et al.*, 2017). Bien que les résultats de Moore *et al.* (2018) montrent également une réduction de l'extrusion du Cl⁻, leur étude révèle que ce sont principalement les activités intrinsèques du co-transporteur qui sont modifiées par ces phosphorylations en C-terminal, plutôt que son expression membranaire (Moore *et al.*, 2018). La phosphorylation de T1007 nécessite plusieurs étapes, commençant par l'activation de la WNK1 (*with-no-lysine kinase 1*), qui à son tour active deux kinases effectrices, SPAK (*STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase*) et OSR1 (*oxidative stress response kinase 1*). La T906 implique également WNK1, mais les effecteurs spécifiques restent inconnus (Zhang *et al.*, 2020). Enfin, d'autres sites de phosphorylations inhibitrices ont été proposés, en particulier sur les résidus de thréonine, dont les plus étudiés sont la thréonine 906 et 1007. Ces phosphorylations sont connues pour déstabiliser les KCC2 membranaires et activer la voie de dégradation lysosomale (Lee, Jurd and Moss, 2010)

résultats ont montré que l'homéostasie du chlore était altérée au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, avec une diminution à la fois totale et membranaire de l'expression des KCC2 dans les neurones matures. Dans la suite de leur étude, ils ont également exploré le mécanisme à l'origine de cette dérégulation. Les expériences ont révélé que l'interaction APP/KCC2 contribuerait à limiter la phosphorylation des résidus de tyrosine impliqués dans la dégradation lysosomale (Figure 32).

D'autres chercheurs ont examiné les conséquences de l'interaction entre l'APP et les KCC2, et de façon surprenante, des résultats opposés ont été observés dans des cultures primaires de neurones corticaux. Les travaux de Doshina *et al.* (2017) rapportent une réduction de l'expression totale des KCC2 en présence de l'APP humain, impliquant le facteur USF1 (*upstream stimulating factor 1*), un régulateur de la transcription du gène Slc12a5, qui code pour KCC2 (Doshina *et al.*, 2017). Bien que les effets de l'APP varient en fonction de la localisation des cellules neuronales et de leur stade de maturité, il semble que la protéine APP joue un rôle important dans la régulation de l'expression des KCC2.

En explorant les interactions protéiques des KCC2 dans des neurones corticaux de rats, l'équipe d'Al Awabdh *et al.* (2022) a identifié 271 partenaires potentiels, dont la géphyrine, une protéine connue pour stabiliser les récepteurs GABAA et de la glycine au niveau des synapses inhibitrices (Lévi *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). Leur étude montre que la géphyrine peut se lier au domaine C-terminal stabilisateur des KCC2. Ils ont quantifié l'expression des KCC2 dans des cellules Neuro2A co-exprimant ou non la géphyrine, et ont observé une expression deux fois plus élevée en cas de co-expression KCC2/géphyrine, avec des clusters où les protéines étaient fréquemment colocalisées (Al Awabdh *et al.*, 2022). De plus, ces travaux suggèrent que la géphyrine régule également la fonction du co-transporteur dans les neurones hippocampiques en augmentant l'extrusion du chlore intracellulaire.

La transmission neuronale

L'activité neuronale constitue l'un des éléments majeurs régulant l'expression et la fonction des KCC2. Lorsque la transmission neuronale est perturbée, l'expression membranaires des co-transporteurs ainsi que leur activité peuvent être modifiées afin de compenser transitoirement ces perturbations. Cette modulation, médiée par les KCC2, serait essentielle car les variations de concentrations intracellulaires de chlore qui en résultent impactent directement l'activité GABAergique et les fonctions neuronales telles que l'apprentissage (Figure 32). (Fiumelli and Woodin, 2007). L'une des voies de régulation de l'expression des KCC2 est liée à l'influx de calcium généré par l'activation des récepteurs NMDA lors de l'activation glutamatergique. L'entrée de calcium entraîne la déphosphorylation de la S940 et le clivage du domaine C-terminal par la calpaïne, ce qui conduit à une réduction de l'expression membranaire des KCC2 (Puskarjov *et al.*, 2012; Chamma *et al.*, 2013).

Des études sur la potentialisation à long terme (LTP) ont également observé ce phénomène. Wang *et al.* (2006) ont montré que l'activation des récepteurs NMDA génère un flux de calcium qui diminue l'expression des KCC2 et contribue ainsi à l'augmentation de la potentialisation dans l'hippocampe des rats (Wang, Gong and Xu, 2006). De plus, lors de l'activité glutamatergique, l'entrée de calcium responsable de la régulation négative des co-transporteurs peut également être initiée par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants (VGCCs) (Fiumelli, Cancedda and Poo, 2005).

A propos de l'activité neuronale inhibitrice, peu d'études mentionnent son impact sur la régulation des KCC2. Néanmoins, d'après les analyses réalisées par Heubl et son équipe sur des neurones hippocampiques de souris, l'activation des récepteurs GABA_A serait à l'origine d'une réduction de l'expression membranaire des KCC2 (Heubl *et al.*, 2017). Le mécanisme proposé implique l'activation de la kinase WINK1 et la phosphorylation des Thréonines 906 et 1007 précédemment présentée en tant que phosphorylation négatives.

Un dernier mécanisme de régulation GABAergique semble impliqué les récepteurs métabotropiques GABA_B. Wright *et al.* (2017) ont effectivement mis en

évidence une association entre l'activation des GABA_B qui favoriserait l'internalisation des KCC2 par la voie d'endocytose clathrine-dépendante (Wright *et al.*, 2017).

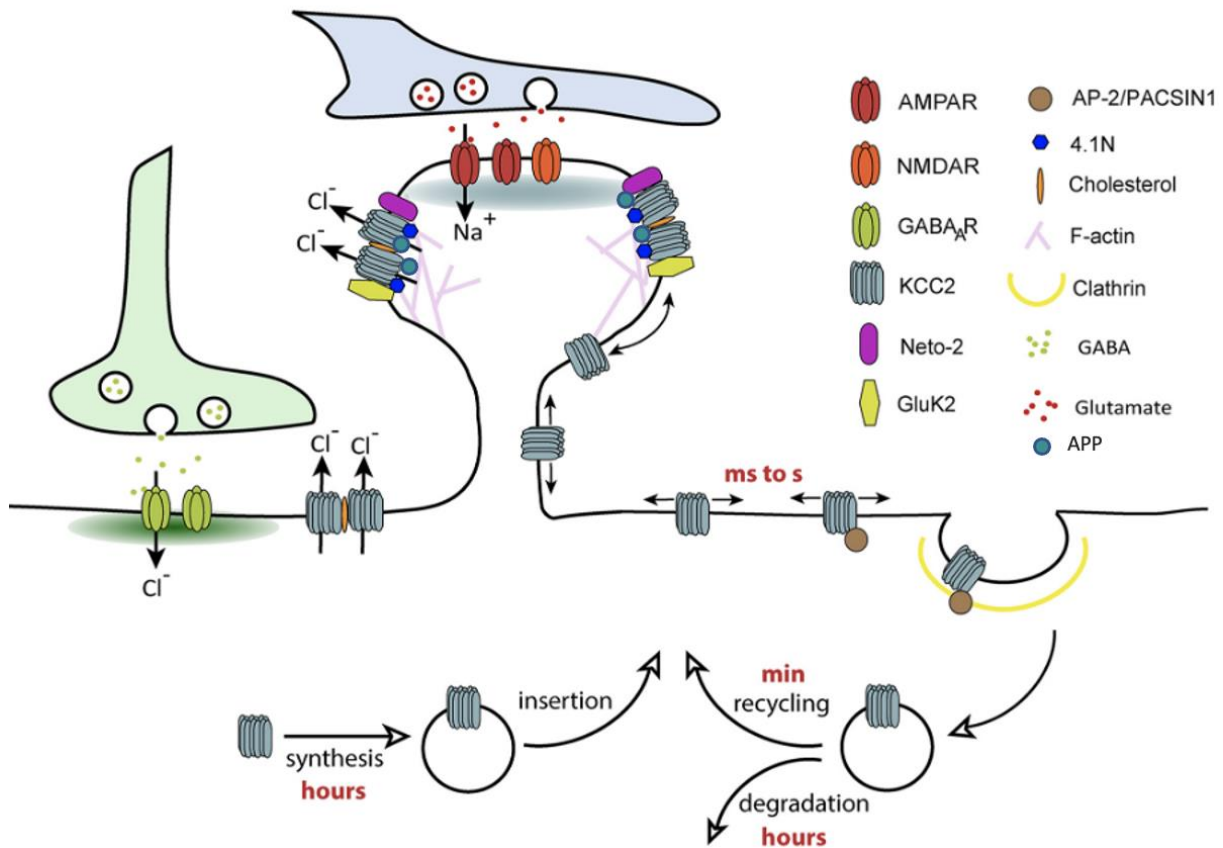


Figure 32 : Régulation endogène de l'expression membranaire et de la fonction des KCC2 (adaptée de Côme et al., 2019). De nombreuses protéines sont impliquées dans le trafic des KCC2 dont le taux de renouvellement à la membrane plasmique est compris entre 20 et 30 minutes. La dynamique de ce trafic repose à la fois sur des processus phosphorylation activatrices ou inhibitrices mais aussi sur des interactions protéiques qui participent à la stabilisation des KCC2 ainsi qu'à leur dégradation au sein d'un cycle endocytose/exocytose complexe pouvant être influencé par l'activité neuronale.

c) Régulations pharmacologiques

Depuis leur découverte par Payne et son équipe en 1996, les co-transporteurs KCC2 ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du chlore et plus généralement dans la régulation de la neurotransmission. Leur implication dans le développement de diverses pathologies neurologiques telles que l'épilepsie ou encore la maladie d'Alzheimer en ont fait une cible thérapeutique importante. Cette prise de conscience a permis le développement

de composés pharmacologiques capables de moduler leur fonction et/ou leur expression neuronale.

Les CLP257 et CLP290

La découverte du CLP 257 est le résultat de plusieurs études initiées par Yves de Koninck visant à identifier des composés pouvant augmenter l'activité des KCC2. A la suite d'un premier criblage réalisé sur plus de 92 000 composés, 78 candidats capables de diminuer la concentration de chlore intracellulaire ont été sélectionnés (Gagnon *et al.*, 2013).

Par la suite, de nouvelles analyses prenant en compte la toxicité, la facilité de synthèse et la spécificité des composés ont permis l'identification du CLP 257. D'après les premiers résultats obtenus, le CLP 257 permettrait à la fois une diminution de 40% de la concentration de chlore intracellulaire et une augmentation significative du transport ionique (Delpire *et al.*, 2009; Gagnon *et al.*, 2013). Les chercheurs se sont alors interrogés sur les mécanismes pouvant conduire à de tels effets. Ils ont tout d'abord quantifié l'expression membranaire et totale des KCC2 en ayant recours aux expériences de biotinylation de surface sur des tranches de moelle épinière de rats. Les résultats ont montré une augmentation marquée de l'expression des monomères et des dimères à la membrane des cellules. En parallèle, des études pharmacocinétiques ont révélé une diminution rapide de la concentration plasmatique du CLP 257, avec une demi-vie de seulement 15 minutes. Des analyses métaboliques ont également indiqué que le CLP 257 est ciblé par la glucurono-conjugaison au niveau de ses groupements hydroxyles, ce qui rend ce composé rapidement inactif.

A partir de ces résultats, il est apparu nécessaire de synthétiser un composé possédant les mêmes propriétés à l'égard des KCC2, tout en garantissant un effet pharmacologique plus stable dans le temps. Pour répondre à cette nécessité, les auteurs ont généré le CLP 290. En raison de l'ajout d'un carbamate permettant de protéger le groupement hydroxyle, la demi-vie de cette prodrogue a été amplement augmentée et estimée à 5 heures. Le CLP 290 aurait également une concentration plasmatique plus importante et semblerait ne pas induire d'effet secondaire.

Suite à l'étude de Gagnon *et al.* (2013), les CLP 257 et 290 ont été largement utilisés, mais les effets rapportés concernant leurs mécanismes d'action ont été remis en question. En effet, une étude de Cardarelli *et al.* (2017) réalisée sur des cellules NG-108 n'a révélé aucun changement dans la concentration intracellulaire de chlore après une exposition de 5 heures au CLP 257. De plus, cette étude remet en question l'effet du traitement sur l'amélioration des fonctions du KCC2 annoncée par Gagnon et son équipe. Selon Cardarelli et ses collaborateurs, le traitement n'induit pas de potentialisation du transport ionique dans les cellules HEK293, mais semble plutôt potentialiser l'activité des récepteurs GABA_A (Cardarelli *et al.*, 2017).

Face à ces divergences, l'équipe d'Yves de Koninck a mené une nouvelle série d'expériences complémentaires pour réaffirmer leurs résultats. Concernant l'étude de Cardarelli, plusieurs éléments pourraient expliquer les résultats opposés. Par exemple, la concentration de CLP 257 utilisée (100 μ M) était bien supérieure à celle employée par Gagnon *et al.* (0,6 μ M). De plus, l'étude de Cardarelli a utilisé des cellules HEK293 surexprimant le KCC2, ce qui pourrait poser problème étant donné que l'expression physiologique des KCC2 n'est pas conservée dans ce modèle.

Malgré cette controverse, les effets des CLP ont été explorés pour diverses pathologies, notamment l'épilepsie. Les études de Dzhala et Stanley (2021) ont montré qu'en fonction de sa concentration, l'application de CLP 257 (1-30 μ M) sur des tranches d'hippocampe restaurait l'homéostasie du chlore et était associée à une réduction de la fréquence des crises d'épilepsie dans un modèle murin d'épileptogénèse (Dzhala and Staley, 2021).

L'effet des CLP a également été évalué dans le cadre d'une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour laquelle une altération de la transmission GABAergique avait été constatée. Barbour et ses collaborateurs ont montré que le CLP 257 permettait de réduire l'expression des KCC2 et l'hyperpolarisation GABAergique caractéristique de l'infection (Barbour *et al.*, 2020). Par la suite, des expériences réalisées par la même équipe sur des souris transgéniques HIV-1 Tat ont également mis en évidence une restauration de l'expression des KCC2 associée à l'augmentation de la phosphorylation sur la S940 (Barbour *et al.*, 2021).

Bien que les CLPs soient des composés pharmacologiques extrêmement prometteurs pour le traitement des maladies pour associées à une altération de l'activité GABAergique, leur mécanisme d'action concernant l'expression des KCC2 doit être caractérisé avant de considérer leur utilisation thérapeutique.

La prochlorpérazine

Depuis l'identification du CLP 257, de nouveaux potentialisateurs de l'activité du KCC2 ont été recherchés. De nombreuses molécules candidates ont alors été testées dont la prochlorpérazine (PCPZ), un dérivé antipsychotique de la pipérazine et de la phénothiazine qui présentait la meilleure efficacité et aucun effet cytotoxique (Liabeuf *et al.*, 2017). Les effets de la PCPZ (10 μ M) ont d'abord été évalués sur des motoneurons de la moelle épinière de rats nouveau-nés. Les enregistrements électrophysiologiques obtenus ont montré un effet positif du traitement sur l'extrusion du chlore intracellulaire parallèlement à une augmentation de la transmission synaptique inhibitrice. Afin de vérifier l'implication des KCC2, les co-transporteurs ont été quantifiés par immunomarquage. Les mesures effectuées ont confirmé une augmentation significative de l'expression des KCC2 à la suite de l'application de la PCPZ.

Bien que la PCPZ semble prometteuse, tout comme le CLP, les mécanismes sous-jacents à ses effets observés sur les KCC2 restent inconnus. Toutefois, un avantage non négligeable de cette molécule est qu'elle est déjà utilisée en traitement clinique, ce qui pourrait faciliter et accélérer son adaptation à d'autres pathologies, tout en réduisant les coûts. En effet, la PCPZ est prescrite comme antipsychotique dans le traitement de la schizophrénie, par exemple. Son mode d'action principal consiste à bloquer les récepteurs dopaminergiques D2. Cependant, d'autres cibles ont également été identifiées, telles que les récepteurs histaminiques, noradrénergiques, sérotoninergiques, et cholinergiques, ainsi que les transporteurs de la dopamine et de la norépinéphrine (Silvestre, J.S. and Prous, J., 2005; Hempel *et al.*, 2013). Elle est aussi administrée dans le cadre des migraines pédiatriques ou des nausées et vomissements associés à la chimiothérapie (Lindley *et al.*, 2005; Bachur, Monuteaux and Neuman, 2015).

Compte tenu de la diversité des cibles pharmacologiques de la PCPZ, divers effets indésirables ont été répertoriés. Parmi ceux-ci, on trouve des symptômes de dystonie aiguë, de parkinsonisme ou encore d'akathisie qui sont liés à son action antipsychotique (Olsen, Keng and Clark, 2000; Kelley and Tepper, 2012). Des troubles oculaires tels que la cataracte ou encore des troubles cutanés (pigmentation, urticaires) ont été également identifiés (Caughey *et al.*, 2010). Enfin, la PCPZ peut entraîner des effets anti-adrénergiques (hypotension), antihistaminiques (sédation) et anticholinergiques (anorexie, constipation, rétention urinaire).

D. Neurotransmission Hippocampique et Pathologie d'Alzheimer : Rôle du peptide A β

1) Effet hormétique du peptide A β

Le peptide β -amyloïde a été caractérisé pour la première fois par le pathologiste américain George Glenner en 1984. Bien que ses recherches initiales aient principalement porté sur son implication pathologique dans la maladie d'Alzheimer (MA), les recherches se sont depuis concentrées sur ce rôle spécifique. Ce n'est qu'en 1990, grâce aux travaux de Yankner *et al.*, que les fonctions physiologiques du peptide β -amyloïde ont été décrites pour la première fois, mettant en lumière ses propriétés neurotrophiques. Il a été démontré qu'un traitement avec des concentrations picomolaires (pM) de β -amyloïde pouvait favoriser la survie des neurones hippocampiques immatures en culture (Yankner, Duffy and Kirschner, 1990).

Ces observations ont été corroborées en 2009 par Giuffrida et ses collaborateurs, qui ont montré que les monomères de β -amyloïde pouvaient soutenir la survie des neurones en développement lorsque les cultures étaient privées de facteurs trophiques. Parallèlement, ils ont découvert que ces monomères pouvaient protéger les neurones matures contre les phénomènes d'excitotoxicité (Giuffrida *et al.*, 2009).

A cette fonction neurotrophique s'ajoutent des fonctions immunitaires. Le peptide A β est un ligand des récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans la réponse immunitaire et aurait en plus des propriétés antimicrobiennes contre huit micro-organismes courants (Le *et al.*, 2001; Soscia *et al.*, 2010). Le peptide β -amyloïde semble également jouer un rôle dans la régulation de l'activité synaptique. Les travaux publiés par Abramov *et al.* (2009), réalisés sur des tranches et des cultures d'hippocampe de souris, ont montré que le β -amyloïde agissait comme un activateur de la libération de neurotransmetteurs (Abramov *et al.*, 2009).

Ces données ont été confirmées plus récemment par une étude montrant que l'application de très faibles concentrations d'oligomères (200pM) sur des tranches d'hippocampes de rats se traduisait par une augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs (mEPSCs) (Gulisano *et al.*, 2019). En plus de l'effet notable sur la transmission synaptique, l'A β oligomérique (A β _o) semble aussi favoriser les processus de mémorisation. Puzzo *et al.* (2008) ont montré qu'une application picomolaire d'A β pouvait induire une augmentation de la plasticité à long terme (LTP) (Puzzo *et al.*, 2008). Cependant, dans une étude ultérieure par la même équipe, une concentration plus élevée de β -amyloïde, de l'ordre du nanomolaire, semblait avoir des effets délétères sur la plasticité synaptique (Puzzo, Privitera and Palmeri, 2012).

Ces résultats ont permis de mettre en évidence un fait essentiel concernant le peptide : la toxicité de l'A β ne réside pas dans le peptide lui-même, mais dans la concentration à laquelle il est présent dans le cerveau. Cet effet hormétique du peptide suggère donc qu'il existe une concentration physiologique seuil au-delà de laquelle le peptide devient toxique. D'après des mesures effectuées dans le cerveau de souris par microdialyse *in vivo*, la concentration physiologique du peptide serait de l'ordre du picomolaire (Teich, Patel and Arancio, 2013). Il apparaît donc qu'un déséquilibre entre la production du peptide A β et sa clairance puisse constituer l'un des mécanismes clés dans le déclenchement de la maladie d'Alzheimer. Ce constat fait écho à l'hypothèse amyloïde qui fait de l'accumulation du peptide l'élément à l'origine de la pathologie.

2) A β et synaptotoxicité

Dans la section précédente, nous avons observé que la différence entre le rôle physiologique et pathologique du peptide A β dépend essentiellement de sa concentration. À présent, dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, il est crucial de comprendre comment l'accumulation d'A β favorise l'hyperactivité neuronale et la perte synaptique hippocampique caractérisées au cours des premiers stades de la maladie.

a) Altération de la transmission glutamatergique et hyperactivité

Au cours des dernières décennies, de nombreux travaux ont montré que la diminution caractéristique de l'activité neuronale associée aux stades avancés de la maladie d'Alzheimer était précédée d'une période d'hyperactivité. Ce phénomène pathologique, observable dans l'hippocampe bien avant la formation des plaques, a été décrit chez les patients porteurs de mutations familiales de la MA (Quiroz *et al.*, 2010). Cette activité neuronale anormalement élevée, reconnue comme l'un des biomarqueurs précoces de la pathologie, a également été observée dans notre équipe ainsi que par Busche *et al.* (2012) au niveau de l'hippocampe de souris modèles de la MA surproduisant le peptide ou après l'application d'A β dimérique (Busche *et al.*, 2012; Bosson *et al.*, 2017; Paumier *et al.*, 2022).

Face à ces observations, la communauté scientifique s'est penchée sur les mécanismes par lesquels l'accumulation d'A β pourrait induire cette hyperactivité. Une hypothèse initiale suggérait que l'augmentation de la concentration d'A β pourrait perturber l'activité synaptique excitatrice. Des recherches ont alors été menées pour évaluer l'impact de l'A β sur la régulation de l'homéostasie du glutamate, le principal neurotransmetteur impliqué dans la transmission excitatrice. Ces investigations ont révélé plusieurs éléments clés. Premièrement, elles ont mis en évidence les mécanismes de recapture et de dégradation du glutamate. En conditions normales, les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique doivent être rapidement dégradés ou recapturés. Pour le glutamate, la recapture est principalement assurée par les astrocytes, qui concentrent la majorité des transporteurs de glutamate.

la majorité des transporteurs au glutamate (Figure 33) (Anderson and Swanson, 2000; Mahmoud *et al.*, 2019). De façon intéressante, des analyses *post-mortem*, réalisées sur des échantillons de cerveaux de patients Alzheimer, ont identifié une diminution de l'activité de ces transporteurs, notamment le Glutamate Transporter 1 (GLT-1) aussi appelé EAAT2 pour *Excitatory Amino Acid Transporter 2* (Masliah *et al.*, 1996). Cette réduction a également été décrite pour des échantillons de cerveaux de patients apparentés MCI, c'est-à-dire sans trouble cognitif apparent mais avec un cerveau présentant les caractéristiques anatomiques de la MA (Kobayashi *et al.*, 2018).

Enfin, Zott *et al.* (2019) ont plus récemment confirmé qu'une application d'A β sur des neurones hippocampiques de souris était responsable d'un défaut de recapture du glutamate et serait à l'origine d'une hyperactivité (Zott *et al.*, 2019).

En plus de la perturbation des mécanismes de recapture du glutamate, la dégradation de ce neurotransmetteur semble elle aussi affectée. Plus précisément, l'activité de la glutamine synthétase, l'une des enzymes impliquées dans ce processus, semble perturbée par la présence excessive du peptide A β (Butterfield *et al.*, 1997). Ces résultats, obtenus chez les malades Alzheimer, ont également été observés dans des modèles murins de la pathologie (Schallier *et al.*, 2011; Hefendehl *et al.*, 2016).

L'altération des processus de recapture et de dégradation du glutamate semble être le principal mécanisme responsable de l'augmentation de sa concentration dans la fente synaptique, favorisant ainsi l'hyperactivité neuronale. Toutefois, cette accumulation de glutamate pourrait également découler d'une augmentation de sa libération par le neurone présynaptique. Cette seconde hypothèse a été étudiée et a donné des résultats inattendus. Par exemple, des recherches menées par Russel *et al.* (2012) sur des neurones hippocampiques montrent qu'une application d'A β ₄₂ (50 nM) peut fragiliser le complexe vésiculaire VAMP2/Synaptophysine, entraînant une augmentation de la libération présynaptique de glutamate (Russell *et al.*, 2012).

En revanche, l'étude de Talantova *et al.* (2013) contredit ces résultats en ne montrant aucun effet du peptide A β ₄₂, malgré l'utilisation de la même concentration et de la même structure (Talanta *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes menant à l'augmentation du glutamate soient encore débattus, les conséquences de ce déséquilibre sont bien établies et seront discutées dans la section suivante.

b) Excitotoxicité et neurodégénérescence

Comme nous l'avons vu, le glutamate est un acide aminé dont la concentration extracellulaire est étroitement régulée. En conditions normales, sa concentration dans les fentes synaptiques est d'environ 0,6 μM . Lors de la libération, cette concentration peut atteindre environ 10 μM pendant l'activation neuronale. Les mécanismes de recapture et de dégradation permettent un retour rapide à la concentration basale, généralement en 1 à 2 ms (Clements *et al.*, 1992). Dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation du peptide A β ralentit ce retour, entraînant une augmentation prolongée du glutamate, qui peut alors devenir toxique pour les neurones.

La neurotoxicité du glutamate a été démontrée dans les années 1950, lorsqu'il a été ajouté à l'alimentation de souris, entraînant la destruction des neurones rétiniens (Lucas and Newhouse, 1957). Plus tard, en 1969, le neurologue américain John W. Olney a montré que l'injection sous-cutanée de glutamate pouvait provoquer des nécroses dans différentes régions du cerveau. De façon intéressante, ces effets neurotoxiques étaient réduits lorsque les récepteurs au glutamate ou à ses analogues étaient inhibés (Olney, 1969). Ces découvertes ont permis d'établir le rôle majeur des récepteurs au glutamate dans la mort neuronale et ont conduit à la formulation du concept d'excitotoxicité par J.W. Olney. Aujourd'hui, l'excitotoxicité est définie comme une dégénérescence neuronale résultant d'une activation excessive des récepteurs excitateurs (Mattson, 2017).

A ce jour, la quasi-totalité des sous-types de récepteurs au glutamate ont été impliqués dans la médiation de la neurotoxicité. Bien que la base moléculaire de la toxicité du glutamate reste incertaine, il est généralement admis qu'elle dépend en grande partie du Ca^{2+} (Choi, 1992; Sattler *et al.*, 2012). Par conséquent, les récepteurs NMDA (NMDAR), essentiels pour les processus de plasticité, ont été largement étudiés en lien avec les phénomènes d'excitotoxicité. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, il a été démontré que l'augmentation de glutamate médié par peptide A β favorisait l'activation des NMDAR extra-synaptiques (Wang *et al.*, 2013). Il semble donc que l'activation excessive de ces récepteurs joue un rôle crucial dans les processus d'excitotoxicité médiés par le peptide A β .

c) Altération de la plasticité synaptique

Étant donné le rôle central des récepteurs NMDA dans les processus de plasticité synaptique, de nombreuses études ont examiné les conséquences de l'accumulation d'A β sur ces mécanismes. Concernant la LTP, la littérature est sans équivoque et décrit une altération systématique de la potentialisation dont le niveau est cependant très dépendant du modèle murin utilisé (Gengler, Hamilton and Hölscher, 2010; Spires-Jones and Knafo, 2012). Ces résultats semblent toutefois confirmer l'effet du peptide A β sur les processus de plasticité à long terme. Ceci a d'ailleurs été corroboré par les travaux de Shankar (2007, 2008) qui ont démontré que l'application d'A β oligomérique sur des tranches d'hippocampe de souris, obtenues à partir du cortex de patients Alzheimer, inhibait la LTP, augmentait la LTD et réduisait la densité synaptique. Ces modifications étaient dépendantes de l'activation des NMDAR (Shankar *et al.*, 2007, 2008).

Comme mentionné précédemment, le peptide A β influence les récepteurs NMDA extra-synaptiques, augmentant leur activité. Il a été observé que cette activation accrue pouvait entraîner une désensibilisation des récepteurs, qui seraient ensuite internalisés (Snyder *et al.*, 2005). Cette internalisation peut modifier l'influx de calcium intracellulaire et ainsi perturber les processus de plasticité (Rönicke *et al.*, 2011; Kervern *et al.*, 2012). Bien que les processus de plasticité soient principalement dépendants des NMDAR, Guntupalli *et al.* (2016) ont également étudié les effets d'A β sur les récepteurs AMPA (AMPA). Leurs recherches ont révélé que les oligomères d'A β pouvaient altérer le transport des AMPAR, réduisant ainsi leur expression membranaire. Ces altérations contribuent aux défauts de la LTP et à la réduction pathologique de la densité synaptique (Guntupalli, Widagdo and Anggono, 2016).

Parallèlement à ces phénomènes, de nombreux travaux actuels suggèrent que les effets pathologiques des A β os sont dépendants de leur liaison physique avec la protéine membranaire APP. Des travaux réalisés dans notre équipe, au niveau du cortex somato-sensoriel de souris, ont permis de montrer que l'A β extracellulaire peut interagir avec l'APP et favoriser son clivage en A β , propageant et perpétuant ainsi les altérations synaptiques excitatrices (Rolland *et al.*, 2020).

A la suite du clivage de l'APP, les résultats obtenus ont également mis en évidence la formation de deux populations distinctes d'A β . Une partie des A β nouvellement synthétisés s'accumule dans le cytosol, où elle contribue à la diminution des courants excitateurs et à l'altération de la plasticité synaptique. L'autre partie, libérée dans l'espace extracellulaire, est responsable de la propagation de la maladie aux neurones sains voisins. De manière intéressante, les effets délétères des A β os étaient réduits par le blocage pharmacologique de l'activité des enzymes impliquées dans le clivage amyloïdogénique de l'APP.

Ce cercle vicieux, qui entraîne une augmentation supplémentaire de la synthèse du peptide A β , a été confirmé par d'autres études montrant que l'hyperactivité neuronale augmentait également la production et la sécrétion du peptide (Kamenetz *et al.*, 2003; Dolev *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2015).

En résumé, dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer, la surproduction des espèces oligomériques d'A β , observée chez les patients porteurs de mutations familiales, entraîne une dérégulation du glutamate. Cette augmentation de la concentration de glutamate a des effets délétères sur l'équilibre excitation/inhibition de la transmission synaptique hippocampique, contribuant au maintien d'un état hyperactif défavorable aux processus de plasticité et à la survie neuronale. De plus, l'interaction entre A β et APP favorise le clivage de l'APP, ce qui entraîne une augmentation concomitante de la production de peptide A β , permettant ainsi la transmission et la perpétuation des altérations amyloïdes.

d) Perturbation de la transmission inhibitrice et déséquilibre E/I

L'hyperactivité hippocampique précoce induite par l'accumulation d'A β oligomérique a été observée dans de nombreux modèles animaux de la maladie d'Alzheimer comme les souris APP23XPS45 ou hAPPJ20 (Busche *et al.*, 2008; Palop and Mucke, 2016). Dans ces modèles murins, il est intéressant de noter que l'hyperactivité observée était dépendante d'une réduction significative de l'activité inhibitrice GABAergique mettant en jeu les interneurons.

Pendant longtemps, la neurotransmission GABAergique a été considérée comme préservée dans la MA (Rissman, De Blas and Armstrong, 2007). Cependant,

de nombreuses preuves indiquent que des altérations dans la neurotransmission GABAergique jouent un rôle dans la physiopathologie de la maladie et pourraient constituer des cibles pharmacologiques pour les traitements précoces. Ainsi, les recherches sur la maladie d'Alzheimer se sont intensément concentrées sur les mécanismes par lesquels la production pathologique d'A β oligomériques perturbe la transmission inhibitrice, contribuant au déséquilibre excitation/inhibition.

Dans leurs travaux effectués sur des souris hAPP20J, Verret *et al.* (2012) ont par exemple mis en évidence une diminution du nombre d'interneurones, notamment les cellules exprimant la parvalbumine. Cette réduction a été associée à des perturbations du réseau neuronale et des déficits mnésiques qui ont également été confirmés chez des patients Alzheimer (Verret *et al.*, 2012). Plus récemment, un dysfonctionnement des interneurones exprimant la somatostatine a également été détecté, et semble impliqué dans les altérations des capacités mnésiques observées chez les souris APP/PS1- Δ 9 (Schmid *et al.*, 2016).

D'autres études, s'intéressant davantage aux processus cellulaires impliqués dans ces perturbations, ont décrit plusieurs modifications concernant les récepteurs GABAergiques hippocampiques. Les observations ont notamment révélé une réduction importante de l'expression des récepteurs GABA_A, ainsi qu'un changement dans la composition de leurs sous-unités en réponse à l'accumulation d'A β os (Luchetti, Huitinga and Swaab, 2011; Hector and Brouillette, 2021). L'implication des récepteurs GABA_A a été confirmé dans d'autres modèles souris Alzheimer tels que les souris 5XFAD. Dans ce modèle, l'hyperactivité enregistrée dans la région CA1 de l'hippocampe a été corrigée par l'injection intraventriculaire de gaboxadol, un agoniste des récepteurs GABA_A (Li *et al.*, 2021).

De par leur nature ionotropique, l'inhibition postsynaptique, médiée par les récepteurs GABA_A, est en grande partie déterminée par la répartition extracellulaire et intracellulaire des ions Cl⁻. Nous avons précédemment vu que l'homéostasie de cet ion était régulée par l'action antagoniste des co-transporteurs importateurs NKCC1 et exportateurs KCC2 (Ben-Ari, 2014). Dans les neurones matures, un déficit de l'expression des KCC2 pourrait donc conduire à une augmentation de chlore intraneuronal, perturbant la polarité des courants GABAergiques et réduisant ainsi

l'activité inhibitrice. Ce phénomène a été documenté dans l'étude électrophysiologique réalisée par Chen et son équipe, dans laquelle l'altération de la polarité GABAergique et des courants inhibiteurs ont été associés à une diminution de l'expression des KCC2 (M. Chen *et al.*, 2017). De plus, ils ont également rapporté que l'APP pouvait interagir avec le co-transporteur pour maintenir son expression membranaire en empêchant sa dégradation. Selon ces résultats, il semble que l'APP puisse participer à la régulation de l'homéostasie de la transmission inhibitrice en régulant l'expression membranaire des KCC2.

Objectifs

Avec l'allongement de l'espérance de vie, il a été estimé que le nombre de personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer (MA) pourrait tripler d'ici 2050. Face aux enjeux sociétaux de cette pathologie et au fardeau économique qu'elle représente, les recherches sur la MA sont désormais cruciales pour améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents et développer des traitements efficaces pour ralentir ou endiguer sa progression. Des découvertes majeures ont déjà permis l'identification de processus cellulaires impliqués dans l'apparition et le développement de la pathologie. Ainsi, au cours du stade précoce qui précède l'apparition des plaques amyloïdes, une hyperactivité neuronale a été caractérisée au niveau de l'hippocampe. Chez l'Homme, cet état hyperactif est associé à une augmentation de la synthèse des formes oligomériques du peptide $A\beta$ dont la surproduction perturbe l'équilibre entre les transmissions excitatrice et inhibitrice.

Les interneurons GABAergiques sont essentiels pour la régulation de cet équilibre E/I et leur dysfonctionnement a déjà été rapporté dans différents modèles murins de la MA mettant en jeu une diminution de l'expression des co-transporteurs KCC2. En condition physiologique, l'expression des KCC2 est régulée par la protéine APP dont le clivage est augmenté en présence d' $A\beta$.

Ainsi, au regard de ces éléments, l'objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier si l'augmentation du clivage de l'APP, médiée par l'accumulation précoce d'oligomères $A\beta$, pouvait perturber l'équilibre E/I en modifiant l'expression des KCC2. Pour ce faire, mon projet a été organisé en trois axes principaux :

1. Étudier l'effet de la surproduction d'oligomères $A\beta$ sur les transmissions synaptiques hippocampiques glutamatergiques et GABAergiques.
2. Évaluer l'implication de l'APP et du co-transporteur KCC2 dans les perturbations de l'équilibre E/I médiées par les $A\beta$ et identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents.

3. Définir si la restauration pharmacologique de la fonction et de l'expression des KCC2 permet de prévenir les altérations de la transmission synaptique hippocampique caractéristiques des stades précoces de la maladie d'Alzheimer.

Pour explorer ces divers axes de recherche, des coupes aiguës d'hippocampes de souris âgées d'un mois ont été réalisées. L'impact des oligomères d'A β sur la neurotransmission a été évalué par des enregistrements électrophysiologiques effectués au niveau des neurones pyramidaux situés dans le *stratum pyramidale* de la région CA1, en présence d'A β os ou chez des souris APP/PS1-21.

Un paradigme similaire a été utilisé dans l'hippocampe de souris APP^{KO} ou de souris témoins afin d'évaluer le rôle de l'APP et des KCC2 dans les perturbations de l'équilibre excitation/inhibition (E/I). Ces expériences ont été complétées par des analyses biochimiques semi-quantitatives réalisées à la suite de fractionnements cellulaires, permettant la séparation des fractions membranaires et cytosoliques.

Concernant les KCC2, leur quantification a également été effectuée par des marquages immunofluorescents réalisés sur des cultures de neurones hippocampiques. Des études pharmacologiques et biochimiques nous ont ensuite permis de caractériser l'incidence des A β os et du clivage de l'APP sur leur expression et fonction.

Enfin, le potentiel des co-transporteurs, en tant que cible thérapeutique, a été évalué au cours d'une étude électrophysiologique menée sur des animaux transgéniques injectés quotidiennement avec le CLP 290. L'ensemble de ce travail de thèse fera très prochainement l'objet d'une publication scientifique.

Matériel et Méthodes

A. Animaux

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives relatives au soin des animaux élaborées sur la base des directives du Conseil de la Communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/CEE), en accord avec les directives nationales françaises relatives au soin des animaux (protocole APAFIS #39213-202210071415768) et après approbation du comité d'éthique de l'institut des neurosciences de Grenoble. Pour cette étude, les lignées de souris suivantes ont été utilisées :

- Les souris wild-type (WT) sur fond génétique C57Bl6/J (Janvier, Lyon, France).
- Les souris APP/PS1-21 modèle de la maladie d'Alzheimer. Ces animaux co-expriment la mutation suédoise humaine (KM/67/671NL) du gène de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP_{swe}) et la mutation humaine L166P du gène de la préséniline 1 (PS1), toutes deux sous le contrôle du promoteur Thy1. Ces mutations engendrent une augmentation de la production du peptide A β perceptible dès 14 jours. Cette lignée de souris provient du laboratoire du professeur Mathias Jucker et a été maintenue dans un état hétérozygote et rétrocroisée sur un fond génétique C57Bl6/J (Janvier, Lyon, France).
- Les souris C57Bl6/J Knock-Out (KO) pour la protéine précurseur amyloïde (APP^{tm1Dbo} KO ou APP^{KO}) (Laboratoire Jackson).

En dehors des cultures cellulaires qui ont été effectuées à partir d'embryons (E15) provenant de souris WT (C57Bl6/J) gestantes d'âges différents, toutes les expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles dont l'âge était compris entre 25 et 32 jours.

B. Mesures électrophysiologiques de l'activité neuronale

1) Préparation des tranches aigües d'hippocampe

Les tranches aigües d'hippocampe sont des modèles tissulaires qui rendent possible l'étude fonctionnelle de la neurotransmission en conservant l'architecture du réseau hippocampique permettant ainsi de préserver les connexions et l'organisation intercellulaires physiologiques. Les tranches d'hippocampe ont été préparées à partir de souris âgées entre 25 à 32 jours. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale selon le protocole validé par le comité d'éthique de l'institut des neurosciences de Grenoble. Le cerveau a été rapidement prélevé et des tranches sagittales de 300 μm d'épaisseur contenant à la fois le cortex et l'hippocampe ont été coupées dans une solution de coupe glacée (en mM : 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 10 MgSO_4 , 0.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 234 Saccharose, et 11 Glucose) avec un vibratome à lame Leica VT1200S. Les tranches ont été microdisséquées pour isoler l'hippocampe et conservées dans une solution oxygénée de liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) contenant les éléments suivants (en mM) : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , 11 D-glucose, saturée à 95 % d' O_2 et 5 % de CO_2 à 37 ± 1 °C pendant 30 minutes, puis conservée à température ambiante pendant au moins 1 heure avant l'enregistrement.

2) Préparation des oligomères d'A β humains

Le peptide utilisé dans ces expériences a été obtenu à partir du peptide A β_{1-42} recombinant humain (Bachem). L'A β_{1-42} a été remis en suspension dans du 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) à 1 mM (Stine *et al.*, 2003) et maintenu à 4°C jusqu'à l'évaporation complète du HFIP. Les oligomères β -amyloïdes ont été préparés en diluant le peptide A β_{1-42} à 1 mM dans du DMSO puis à 100 mM dans de l'aCSF (en mM : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , et 11 D-glucose). La solution ainsi obtenue a ensuite été soniquée pendant 2 heures à 4°C puis immédiatement vortexée pendant 24 heures à 4°C. Les solutions finales d'A β os utilisées lors des expériences ont été préparées en diluant la solution à 100 nM dans l'aCSF.

3) Enregistrements extracellulaires et mesures de la plasticité neuronale

Pour ces travaux de thèse, toutes les mesures électrophysiologiques ont été réalisées sur une table à air entourée d'une cage de Faraday. La totalité des enregistrements ont été effectués sur des tranches d'hippocampe de 300 μm au niveau des neurones pyramidaux du *stratum pyramidale* situés dans la région CA1. Les tranches d'hippocampe ont été transférées dans une chambre d'enregistrement de type submersion (Nikon Eclipse E600FN) et observées à l'aide d'un grossissement de X4. Une solution d'aCSF oxygénée (en mM : 119 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.3 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , et 11 D-glucose) a été continuellement perfusée dans la chambre (2 mL/min) à 28°C. Les enregistrements extracellulaires ont été mesurés au moyen de deux électrodes. La première appelée électrode de stimulation, a été placée à proximité des collatérales de Schaffer regroupant les axones provenant des

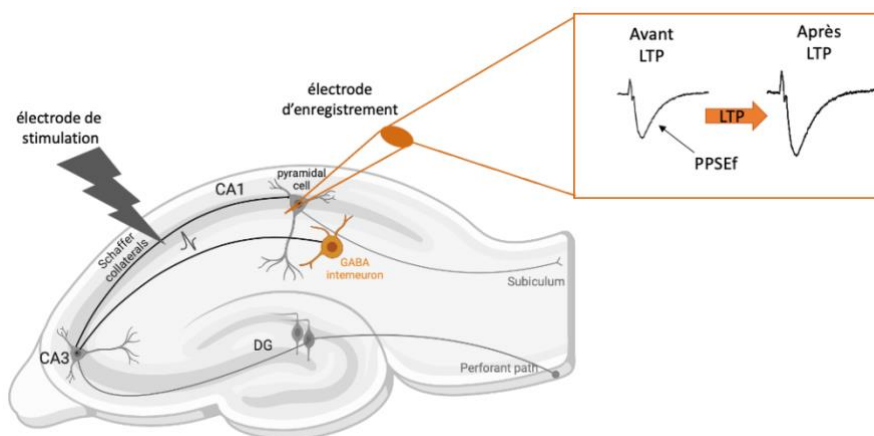


Figure 34 : Mesure des PPSEf extracellulaires dans l'hippocampe. Ce schéma permet d'apprécier la localisation des électrodes de stimulation (gris) située au niveau des collatérales de Schaffer et d'enregistrement (orange) en périphérie du soma des neurones pyramidaux de CA1. Les PPSEf enregistrés sont représentés dans le cadre à droite dans lequel sont illustrées les traces obtenues avant et après induction du protocole de LTP (Figure réalisée sur BioRender.com).

neurones pyramidaux CA3.

La deuxième électrode, dite d'enregistrement, était fixée à une pipette en verre remplie d'aCSF et insérée dans le champ dendritique des neurones pyramidaux CA1 (Figure 34). Ce dispositif permet d'effectuer des

enregistrements extracellulaires en enregistrant simultanément l'activité de plusieurs synapses. Plus précisément, la stimulation des collatérales de Schaffer induit la libération de glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate libéré active les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques permettant ainsi la genèse de flux ioniques à travers la membrane plasmique. Ces mouvements ioniques seront alors détectés comme une déviation négative et transitoire du potentiel appelée potentiel

postsynaptique excitateur de champ (PPSEf) résultant principalement de l'activation des récepteurs glutamatergiques de type AMPA.

Cette approche expérimentale a été utilisée dans le cadre de l'étude des processus de potentialisation à long terme (LTP) présentés dans ce manuscrit. Pour effectuer de tel enregistrements, des stimuli de test ont été délivrés toutes les 15 secondes et l'intensité des stimuli a été ajustée afin de produire 50 % de la réponse maximale du PPSEf. Un enregistrement basal a été effectué afin d'obtenir une ligne de base stable d'un minimum de 15 minutes. Les LTP ont été induites à l'aide du protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) et du protocole de stimulation thêta (TBS). Le premier consiste en 2 stimulations à 100 Hz délivrées avec un intervalle de 20 secondes. Le protocole TBS a été induit par 5 trains de 10 salves de 4 impulsions délivrées à 100 Hz avec un intervalle de 200 millisecondes entre les salves et un intervalle de 20 secondes entre chaque train. Les signaux ont été acquis avec un amplificateur EPC 10 (HEKA Elektronik) et analysés avec le logiciel FitMaster (HEKA Elektronik).

4) Enregistrement patch-clamp en configuration cellule entière

a) Configuration expérimentale

Les enregistrements patch-clamp constituent l'une des techniques de référence en électrophysiologie. Mise au point par Erwin Neher et Bert Sakmann en 1976, cette technique permet d'étudier les propriétés électriques d'une cellule neuronale en temps réel (Sakmann and Neher, 1984). Pour cela, deux électrodes sont nécessaires. La première électrode de référence est placée dans le milieu extracellulaire. La deuxième électrode d'enregistrement, est placée à l'intérieur d'une micropipette en verre (5-6 M Ω) remplie avec approximativement 30 μ l d'une solution reproduisant le milieu neuronal intracellulaire (en mM: 117.5 CsMeSO₄, 15.5 CsCl, 10 TEACl, 8 NaCl, 10 HEPES, 0.25 EGTA, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 5 N-(2,6dimethylphenylcarbamoylemethyl) triethylammonium bromide (QX-314) à 290 mOsm et un pH de 7,3). Au moyen d'un micro-manipulateur, cette électrode est placée

au contact du corp cellulaire du neurone d'intérêt. Une pression négative est alors exercée afin de former une jonction étanche entre la pipette et la membrane. Une fois la pipette scellée avec la membrane neuronale, une aspiration est appliquée pour rompre la membrane et créer un continuum entre le milieu intracellulaire du neurone

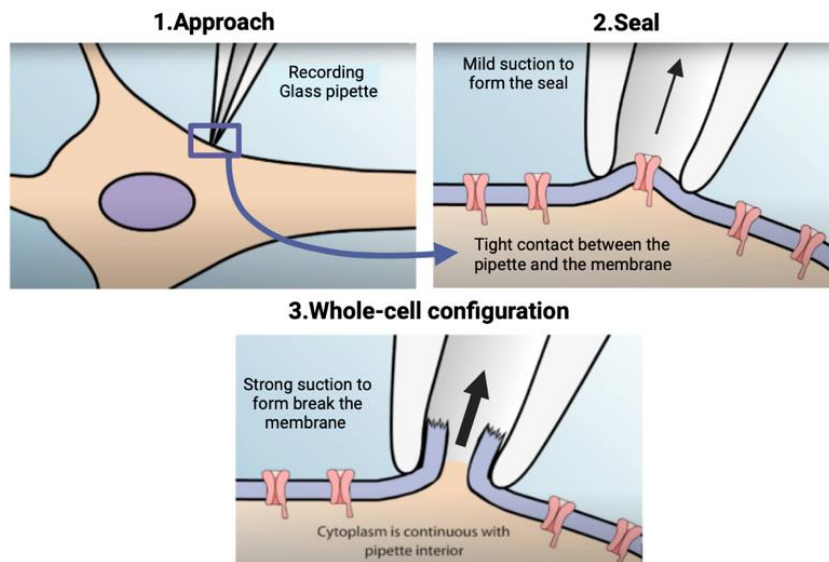


Figure 35 : Procédure du patch-clamp en configuration cellule entière (Figure adaptée réalisée sur BioRender.com adapté de Coquery et al., 2015).

et la solution contenue dans la pipette en verre (Figure 35). Dans cette configuration « cellule entière », les cellules sont observées au grossissement X60. L'électrode de référence correspond au potentiel

extracellulaire et celle d'enregistrement au

potentiel intracellulaire. La différence de potentiel ainsi enregistrée est fonction des propriétés membranaires de la cellule. Les signaux enregistrés ont été acquis à l'aide de l'amplificateur EPC 10 (HEKA Elektronik) filtré à 1 kHz, échantillonné à 10 kHz et analysé avec le programme MiniAnalysis de synaptosoft. La résistance d'entrée et la résistance d'accès au patch ont été surveillées en permanence et les neurones qui présentaient des changements supérieurs à 20 % pour ces paramètres ont été éliminés de l'étude. Le seuil d'amplitude a été fixé à 5 pA, et tous les événements détectés ont été acceptés ou rejetés sur la base d'un examen visuel.

b) Mesure des courants excitateurs et inhibiteurs spontanés

Les courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sEPSCs) ont été enregistrés au potentiel de maintien membranaire de -33 mV. Dans nos conditions expérimentales, ce potentiel membranaire est proche du potentiel d'inversion des courants inhibiteurs GABAergiques. Cela signifie que pour un potentiel membranaire de -33 mV, les courants enregistrés résultent

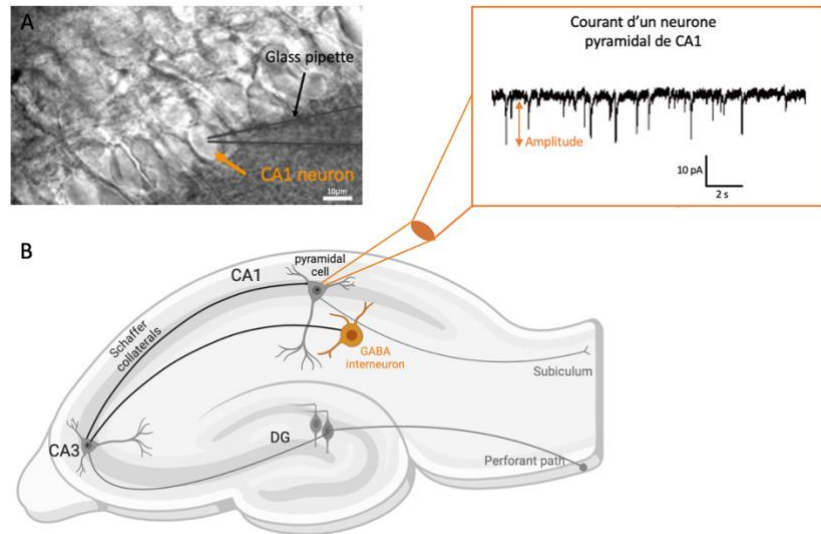


Figure 36 : Mesure patch-clamp des neurones hippocampiques.

A. Enregistrement patch-clamp d'un neurone pyramidal localisé dans le *stratum pyramidale* de la région CA1. B. Schéma de l'enregistrement des courants spontanés d'une cellule unique réalisé par une électrode en configuration cellule entière. Sur la trace obtenue, chaque évènement correspond à la libération d'une vésicule et l'ouverture d'un canal ionique. L'amplitude et la fréquence des évènements sont analysées (Figure réalisée sur BionRender.com).

exclusivement de l'activation de récepteurs glutamatergiques et du passage d'ions à travers les récepteurs AMPA majoritairement. Pour isoler les courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs), un paradigme similaire a été utilisé. Ainsi, les enregistrements ont été obtenus au potentiel de maintien membranaire de $+10$ mV, proche du potentiel d'inversion des courants excitateurs glutamatergiques. Les sEPSCs et les sIPSCs ont été enregistrés après une stabilisation de 5 minutes (Figure 36).

Pour étudier les effets des oligomères $A\beta$ sur l'équilibre Excitation/Inhibition (E/I), les transferts de charge permettant d'établir le rapport E/I ont été mesurés dans les neurones de souris WT après 20 minutes de perfusion d' $A\beta_0$ (100 nM) et normalisés par rapport à la valeur du transfert avant l'ajout d' $A\beta_0$. Le transfert de charge permet d'évaluer non seulement l'amplitude des courants synaptiques, mais aussi leur dynamique temporelle. Il est particulièrement utile pour quantifier l'ensemble des évènements synaptiques (excitateurs et inhibiteurs) et comprendre comment ces évènements influencent le potentiel de membrane d'un neurone. Il permet d'apprécier

l'effet cumulé des synapses actives et donne une vue d'ensemble de l'équilibre E/I au cours du temps. De façon similaire, le rapport E/I a aussi été établi chez les souris APP/PS1-21 et normalisé par rapport à la valeur du transfert de charge mesurée dans les neurones des souris WT issues de la même fratrie.

c) Mesure du potentiel d'inversion

Le potentiel expérimental d'inversion des récepteurs GABA_A (E_{GABA}) a été déduit à partir des IPSCs évoqués (eIPSCs) dans la région hippocampique CA1. Les eIPSC ont été mesurés en configuration cellule entière et pour différentes valeurs de potentiel de membrane en présence de 10 μ M de NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl- benzo[f]quinoxaline) et 50 μ M de D-APV (D-2-amino-5-phosphonovalerate). Les courbes Courant/Voltage (I-V) des canaux GABA_A ont été obtenues en calculant la moyenne de l'amplitude des courants de 4 réponses pour chaque valeur de potentiel membranaire. La différence entre l' E_{GABA} expérimental et l' E_{GABA} théorique (selon l'équation de Nernst) a fourni une estimation de la capacité d'extrusion de Cl⁻.

Pour étudier la plasticité synaptique inhibitrice, des eIPSC en configuration cellule entière ont également été induits dans une région CA1 avec le mode voltage-clamp et un potentiel de maintien membranaire de +10 mV avant et après l'induction de LTP (Basu *et al.*, 2013). Le protocole de LTP appliqué était similaire au protocole TBS mentionné précédemment. Les neurones ont été enregistrés avec le mode courant-clamp pendant le TBS et analysés avec le logiciel FitMaster (HEKA Elektronik).

C. Analyses biochimiques et Imagerie cellulaire

1) Western Blot

Les hippocampes extraits des tranches sagittales de cerveau de 300 μ m d'épaisseur ont été lysés mécaniquement avec un tampon RIPA (en mM : 50 Tris-HCl, pH 7.4, 150 NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % désoxycholate de sodium, 0.1 % SDS, 1

EDTA) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1:100, #P8340-5ML, Sigma) et de phosphatases (1:100, #P5726-5ML, Sigma). La concentration protéique de chaque lysat a été quantifiée en utilisant la méthode de Pierce BCA (Thermo Scientific) et le lecteur de plaques Pherastar (BMG Labtech). Les échantillons ont été dilués dans du tampon de Laemmli (#1610747, Biorad) contenant 10 % de β -mercaptoéthanol puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Pour permettre la migration et la séparation des protéines, une quantité équivalente de protéines (20 μ g) a été déposée dans chaque piste d'un gel polyacrylamide Bis-Tris pré-coulé sans colorant en gradient 4-20 % (Bio-Rad). Les protéines ont été transférées sur des membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0.2 mm (Millipore) pendant 45 minutes à 4°C.

Les membranes ont été saturées avec une solution saline tamponnée au Tris (TBS en mM :10 Tris et 150 NaCl, pH 7.4) contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T) et 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 45 minutes à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : anti-souris APP (1:2000, #22C11, Millipore) anti-lapin GABA α 1 (1:10000#06-868, Millipore) ou anti-lapin KCC2 (1:2000, #07-432, Millipore).

Les membranes ont été lavées dans du TBS-T avant d'être incubées avec les anticorps secondaires appropriés conjugués à la *horseradish peroxidase* (HRP) (IgG anti-souris (Fab') 1:40 000 ou IgG anti-lapin (Fab') 1:40000, Jackson, ImmunoResearch) pendant 45 minutes à température ambiante. Les protéines d'intérêt ont été visualisées à l'aide d'un système de détection ECL à chimiluminescence renforcée (Bio-Rad). Les signaux de chimiluminescence ont été normalisés par rapport aux signaux de chargement des protéines obtenus à partir des gels polyacrylamide préfabriqués (Bio-Rad).

La détection de la chimiluminescence a été réalisée à l'aide d'un système de détection ECL. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel ImageJ. Dans ces expériences, les tranches d'hippocampe traitées avec les A β os humains ont été incubées avec la solution d'oligomères diluée à 100 nM dans de l'aCSF pendant 20 minutes à température ambiante.

2) Co-immunoprécipitation

Les tranches d'hippocampe ont été lysées mécaniquement dans un tampon RIPA (en mM : 50 Tris-HCl, pH 7.4, 150 NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % désoxycholate de sodium, 0.1 % SDS, 1 EDTA) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1:100, #P8340-5ML, Sigma) et de phosphatases (1:100, #P5726-5ML, Sigma). Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 50000 x g pendant 35 minutes à 4°C et la concentration en protéines du surnageant a été mesurée à l'aide du test Pierce BCA (Thermo Scientific). Pendant ce temps, 30 µL de billes magnétiques couplées à la protéine G, préalablement lavées avec du TBS, ont été incubées dans une solution de TBS contenant l'anticorps primaire anti-lapin KCC2 (1:100 #07-432, Millipore), l'anti-souris APP (1:100 # ab32136, Abcam) ou sans d'anticorps (pour le contrôle négatif) pendant 1 heure à température ambiante sur une roue de mouvement. 250 µg de protéines ont ensuite été ajoutés à la solution billes/anticorps et incubés pendant une nuit à 4°C sur une roue à mouvement. Le complexe immunoprécipité a été lavé trois fois avec du TBS, puis les protéines liées aux billes ont été éluées avec du tampon d'éluion (solution saline tamponnée au phosphate (PBS en mM : 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, and 1.8 KH₂PO₄, pH 7.4), Laemmli (#1610747, Bio-Rad) contenant 10% de β- mercaptoéthanol). Enfin, l'éluat a été chauffé à 95°C pendant 10 minutes et un Western blot a été réalisé pour identifier les protéines co-immunoprécipitées.

3) Culture primaire de neurones hippocampiques

Les cultures de neurones hippocampiques primaires ont été réalisées à partir d'embryons de 15 ± 1 jours de développement embryonnaire de souris C57Bl6/J (Janvier, Lyon, France). À la suite de l'extraction du cerveau et la séparation des méninges, les hippocampes ont été disséqués, mécaniquement dissociés et cultivés dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, Lyon, France) contenant 5% de sérum bovin fœtal (Sigma, Lyon, France), 5% de sérum de cheval (Thermo Scientific), et 1 mM de glutamine (Sigma, Lyon, France).

Pour les analyses de microscopie confocale, les neurones ont étéensemencés dans des coupelles contenant un fond en verre de 35 mm (MatTek, Ashland, MA, USA)

préalablement recouvertes avec une solution de coating (0.1 mg/mL de poly-D-lysine et de 0,02 mg/mL de laminine, Sigma-Aldrich). Les cultures ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂/95 % d'air pendant 16 jours *in vitro* (DIV) avant utilisation (Frاندemiche *et al.*, 2014).

4) Fractionnement cellulaire

Pour analyser la distribution subcellulaire des protéines APP et KCC2, des fractionnements cellulaires ont été effectués afin de séparer les fractions membranaires des fractions cytosoliques. Brièvement, des tranches d'hippocampe ont été dissociées et lysées mécaniquement dans un tampon RIPA (en mM : 50 Tris-HCl, pH 7.4, 150 NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % désoxycholate de sodium, 0.1 % SDS, 1 EDTA) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1:100, #P8340-5ML, Sigma) et de phosphatases (1:100, #P5726-5ML, Sigma). Les échantillons ont été maintenus à 4°C pendant toutes les étapes de l'expérience. En premier, les lysats hippocampiques ont été collectés et centrifugés pendant 10 minutes à 2800 rpm pour séparer le noyau. Le surnageant résultant a été centrifugé pendant 10 minutes à 7000 rpm afin de séparer la membrane de la fraction cytosolique. Le culot contenant la fraction membranaire a été solubilisé dans du PBS. Le surnageant a ensuite été centrifugé deux fois à 14700 rpm pendant 10 minutes permettant la séparation des mitochondries de la fraction lysosomale puis à 100000 rpm pendant 30 minutes pour obtenir le surnageant contenant le cytosol. Les échantillons ont été conservés à -20°C. L'intégrité des fractions membranaires et cytosoliques a été vérifiée par Western Blot en utilisant l'anticorps anti-lapin GluR1 (1:500 #AB1504, Millipore), qui est enrichi dans la fraction membranaire. La fraction cytosolique a quant à elle été confirmée avec l'anticorps anti-souris ERK ½ (1:200 #sc-135900, Santa Cruz Biotechnology) enrichi dans ce compartiment.

5) Immunomarquage des neurones hippocampiques

Après 16 jours de cultures *in vitro*, les cellules hippocampiques ont été cultivées dans un milieu de croissance sans sérum et traitées ou non pendant 20 minutes avec une solution d'Aβos dilués dans du DMEM (100 nM). Les cellules ont ensuite été fixées

avec une solution de fixation (4% de paraformaldéhyde et 4% de sucrose dilués dans du PBS, à pH 7,3) pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées dans du PBS-T et traitées pour l'immunomarquage. Après saturation et perméabilisation dans une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 (PBS-T) et 3 % BSA, pendant 30 minutes, les cellules ont été incubées sur la nuit à 4° C avec les anticorps primaires anti-KCC2 (1:200 #07-432, Millipore) et anti-Chicken MAP2 (1/2000 #ARG52328, Arigobio). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois dans du PBS-T et incubées avec les anticorps secondaires conjugués Alexa Fluor 647 ou Alexa Fluor 594 de Life Technologies (1:1000 ; Thermo Fisher Scientific) pendant 1 heure dans l'obscurité. Après trois lavages avec le PBS-T, les cellules ont été incubées pendant 5 min avec le colorant Hoechst (1:1000#33258, Sigma-Aldrich) pour la coloration des noyaux puis disposées sur des lamelles avec le milieu de montage fluorescent DAKO (DAKO). Les lamelles ont été conservées dans l'obscurité à 4°C.

6) Imagerie confocal sur cellules fixées

Les cultures de neurones hippocampiques ont été examinées sous un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 710 avec un objectif Plan Neofluar X63 à immersion dans l'huile (NA 1,46) combiné à un module Zeiss Airyscan pour améliorer la résolution latérale (≈ 140 nm) et le rapport signal/bruit. Toutes les images ont été enregistrées en utilisant les mêmes paramètres d'exposition. Pour chaque immunomarquage, les projections d'intensité maximale de 12 coupes confocales z consécutives ont été traitées dans ImageJ. Pour l'analyse quantitative, les images ont été fusionnées dans ImageJ et l'intensité de la fluorescence de KCC2 a été évaluée en mesurant la fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF : densité intégrée - (surface de la cellule sélectionnée X fluorescence moyenne du fond de l'image) divisée par la surface de la région d'intérêt (ROI) à l'aide des fonctions Analyser et Mesurer du logiciel. Pour les illustrations, les images ont été fusionnées avec ImageJ.

D. Injections intrapéritonéales

Les souris APP/PS1-21 mâles et femelles, ainsi que les souris WT issues de la même portée et appariés en fonction du sexe et l'âge, ont été injectées quotidiennement par voie intrapéritonéale avec 50 µl de substance pharmacologiquement active ou 50 µl de véhicule / 10 g de souris à partir du 14^{ème} jour postnatal correspondant au début de la production du peptide Aβ. Le CLP-290 (#6758, Tocris), un agent pharmacologique capable d'augmenter l'expression et la fonction des co-transporteurs KCC2, a été concentré à 20 µg/µl et injecté dans 50 µl de 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrine à 20 % (20 % HPCD) comme décrit précédemment (Chen *et al.* 2017).

E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism 11 (GraphPad Software ; USA). Pour la comparaison de trois groupes ou plus, la distribution normale des données a d'abord été évaluée avec le test de normalité de Shapiro-Wilk. Nous avons effectué, pour les données normalement distribuées, une ANOVA à sens unique suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey. Si les données ne suivaient pas une distribution normale, nous avons effectué un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn. La comparaison entre deux groupes a été évaluée par un test t bilatéral non apparié. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM, "n" indiquant le nombre d'animaux, le nombre de tranches d'enregistrement ou le nombre de neurones enregistrés. Les niveaux de significativité graphiques sont présentés ainsi : *p <0.05 ; **p <0.01 ; ***p <0.001 ; ****p <0.0001 ; ns = non significatif

Résultats

I. Altération de la neurotransmission hippocampique, l'un des premiers événements physiopathologiques induit par l'amyloïde- β

A. Altération de l'équilibre E/I médiée par les oligomères β -amyloïdes

Comme souligné précédemment, des travaux antérieurs réalisés dans notre équipe ont permis de constater que la présence d'A β extracellulaire pouvait augmenter le clivage de l'APP (Rolland *et al.*, 2020). En s'appuyant sur ces résultats, nous avons voulu étudier l'implication de l'APP et de son clivage excessif sur la dérégulation de l'équilibre E/I mis en évidence au cours des phases précoces de la maladie d'Alzheimer. Pour cela, il était tout d'abord nécessaire d'établir un premier bilan permettant d'apprécier les effets de la surproduction d'A β sur la transmission neuronale de l'hippocampe. Si des perturbations de la transmission glutamatergique ont déjà été soulignées, les conséquences sur la transmission inhibitrice et l'équilibre E/I restent à définir (Paumier *et al.*, 2022).

Pour estimer l'effet de la surproduction d'A β sur la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique, nous avons réalisé des enregistrements patch-clamp de neurones pyramidaux de la région CA1 sur des tranches sagittales d'hippocampe. Ces enregistrements, effectués en configuration cellule entière, et en mode voltage-clamp, nous ont permis d'enregistrer les courants postsynaptiques spontanés. Les résultats ont été obtenus à la suite d'enregistrements d'une durée de 20 minutes en présences ou non d'A β synthétiques perfusés à 100 nM. Comme indiqué à la **Figure 1**, nous avons noté une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (sEPSCs) (amplitude moyenne : 7.89 ± 0.47 pA en condition véhicule ; n=10 et amplitude moyenne : 10.8 ± 0.61 pA en condition A β ; n=10 ; p=0.0015 ; fréquence moyenne : 1.35 ± 0.065 Hz en

condition véhicule ; n=10 et fréquence moyenne : 1.97 ± 0.16 Hz en condition A β_0 ; n=10 ; p=0.0018 ; **Figure 1 A, B**).

En revanche, concernant les courants spontanés inhibiteurs, l'amplitude et la fréquence des sIPSCs ont été significativement réduites après perfusion avec l'A β_0 (amplitude moyenne : 11.37 ± 0.63 pA en condition véhicule ; n=8 et amplitude moyenne : 6.006 ± 0.34 pA en condition A β_0 ; n=9 ; p<0.0001 ; fréquence moyenne : 5.11 ± 0.07 Hz en condition véhicule ; n=8 et fréquence moyenne : 3.2 ± 0.073 Hz en condition A β_0 ; n=9 ; p<0.0001 ; **Figure 1 C, D**). Enfin, l'équilibre E/I a été évalué en comparant les transferts de charge. À l'issue de ces dernières analyses, une augmentation de l'équilibre E/I a été mis en évidence à la suite de l'exposition aux oligomères A β ($E/I_{A\beta_0}$: $+59.53 \pm 6.52$ % par rapport au véhicule ; **Figure 1 E, F**).

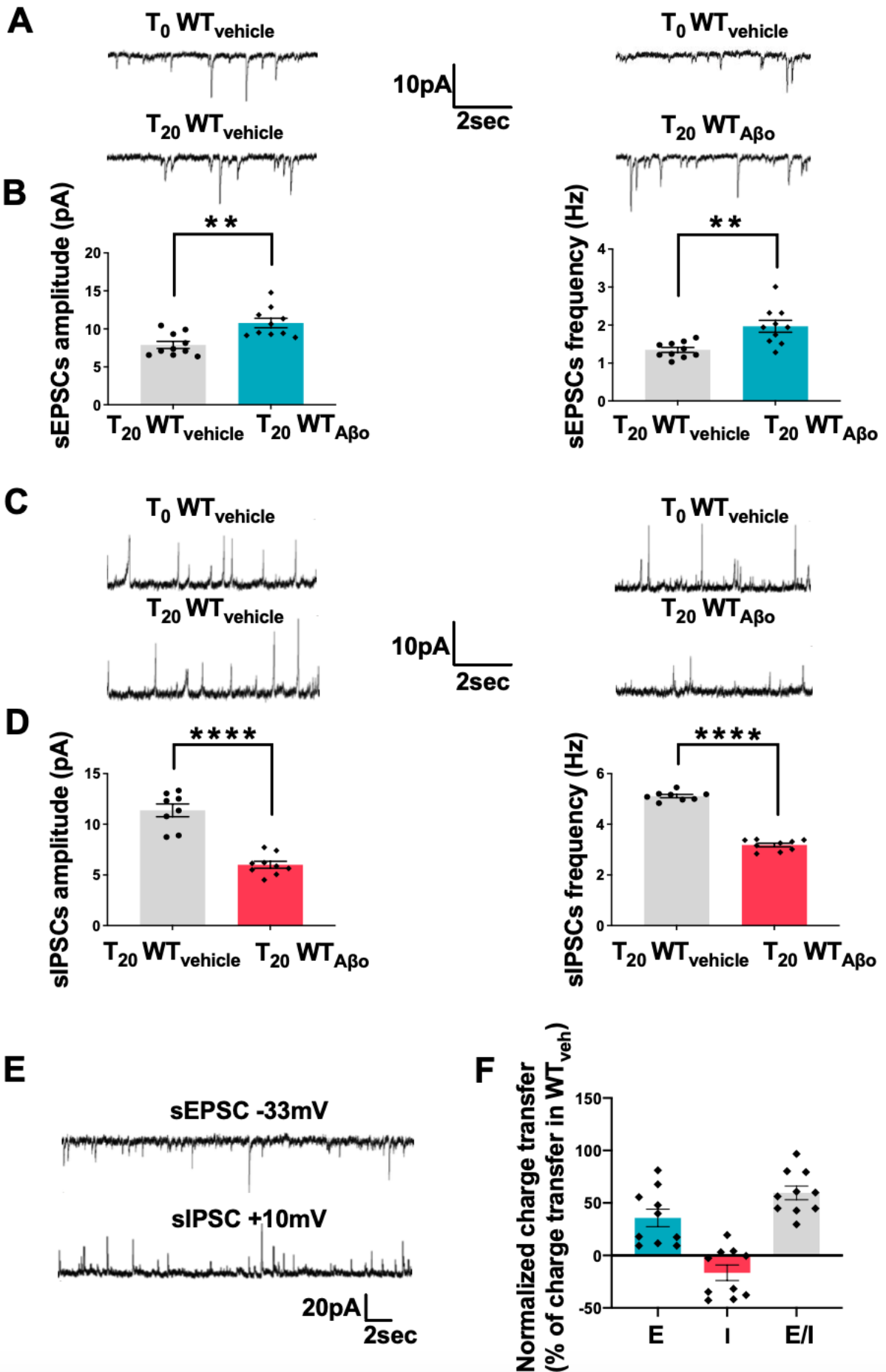


Figure 1 : Les oligomères β -amyloïdes perturbent la balance Excitation/Inhibition des neurones pyramidaux de la région CA1 chez les souris WT.

A, Traces représentatives des sEPSCs enregistrés à -33 mV dans les neurones CA1 à partir de tranches d'hippocampe de souris WT, extraites au début de l'expérience (T0 WT_{véhicule}, panneau gauche) et 20 min après perfusion du véhicule (T20 WT_{véhicule}, panneau gauche) ou au début de l'expérience (T0 WT_{véhicule}, panneau droit) et 20 min après perfusion d'A β o (T20 WT_{A β o}, panneau droit).

B, Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sEPSCs enregistrées à T20 dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT, perfusées avec le véhicule (WT_{véhicule}, barre grise, n = 10 neurones) ou perfusées avec l'A β o (WT_{A β o}, barre bleue, n = 10 neurones). p = 0.0015 pour l'amplitude et p = 0.0018 pour la fréquence.

C, Traces représentatives des sIPSCs enregistrés à +10mV dans les neurones CA1 à partir de tranches d'hippocampe de souris WT, extraites au début de l'expérience (T0 WT_{véhicule}, panneau gauche) et 20 min après perfusion du véhicule (T20 WT_{véhicule}, panneau gauche) ou au début de l'expérience (T0 WT_{véhicule}, panneau droit) et 20 min après perfusion d'A β o (T20 WT_{A β o}, panneau droit).

D, Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrées à T20 dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT, perfusées avec le véhicule (WT_{véhicule}, barre grise, n = 8 neurones) ou perfusées avec l'A β o (WT_{A β o}, barre rouge, n = 9 neurones). p < 0.0001 pour l'amplitude et p < 0.0001 pour la fréquence des sIPSCs.

E, Traces représentatives des sIPSCs et sEPSCs provenant du même neurone pyramidal de souris WT après 20 min de perfusion avec l'A β o.

F, Le graphique représente la valeur moyenne du transfert de charge mesurée 20 min après perfusion d'A β o, normalisée par la valeur du transfert de charge mesurée avant la perfusion d'A β o (E : afférence excitatrice/sEPSCs, barre bleue ; I : afférence inhibitrice/sIPSCs, barre rouge ; E/I : barre grise ; n = 10). Tests t non appariés **p < 0.01 ; ****p < 0.0001.

B. Implication de l'APP et de son clivage dans les perturbations de la neurotransmission provoquées par l'A β o

Comme décrit dans les rapports de Wang *et al.* (2017) et Puzzo *et al.* (2017), les effets des oligomères A β sur la transmission synaptique glutamatergique nécessitent l'expression de l'APP (Puzzo *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Afin de démontrer si l'APP est également impliqué dans les perturbations de la neurotransmission inhibitrice induites par l'A β o et décrite en **Figure 1**, les sIPSCs ont été enregistrés dans des tranches de souris APP^{KO} en absence ou en présence d'oligomères. Nous avons observé une diminution significative de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrés dans les tranches de souris APP^{KO} par rapport aux tranches de souris WT (amplitude moyenne : 11.37 ± 0.63 pA en condition véhicule WT ; n=8 et amplitude moyenne : 7.56 ± 0.55 pA en condition véhicule APP^{KO} ; n=10 ; $p < 0.0001$; fréquence moyenne : 5.112 ± 0.06623 Hz en condition véhicule WT ; n=8 et fréquence moyenne : 1.887 ± 0.1837 Hz en condition véhicule APP^{KO} ; n=10 ; $p < 0.0001$; **Figure 2 A, B**).

Fait intéressant, lorsque les tranches APP^{KO} ont été perfusées avec l'A β o, aucun changement supplémentaire n'a été observé par rapport aux tranches APP^{KO} traitées avec le véhicule (amplitude moyenne : 7.56 ± 0.55 pA en condition véhicule APP^{KO} ; n=10 et amplitude moyenne : 7.52 ± 0.44 pA en condition APP^{KO}_{A β o} ; n=10 ; $p > 0.9999$; fréquence moyenne : 1.887 ± 0.18 Hz en condition véhicule APP^{KO} ; n=10 et fréquence moyenne : 1.587 ± 0.16 Hz en condition APP^{KO}_{A β o} ; n=10 ; $p = 0.41$; **Figure 2 A, B**). Par conséquent, l'absence d'APP semble avoir complètement empêché les réductions de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs induites par les oligomères A β . Concernant la transmission GABAergique, ces résultats suggèrent donc que les effets des A β o requièrent l'expression de l'APP.

Dans une étude antérieure, nous avons rapporté que l'altération de la transmission glutamatergique induite par l'A β o dépend non seulement de l'expression de l'APP mais également de son clivage à travers la voie amyloïdogénique. Pour mieux comprendre le mécanisme impliqué dans la modification de la neurotransmission inhibitrice par l'A β o, des tranches hippocampiques de souris WT ont été incubées en présence d'un inhibiteur de la β -sécrétase (β -seci) permettant d'empêcher le clivage de l'APP.

Les sIPSCs ont ensuite été enregistrés avec ou sans application d'A β o. En présence de $1 \mu\text{M}$ de β -seci, bien que la fréquence des sIPSCs apparaisse encore diminuée par rapport au contrôle (fréquence moyenne : 3.2 ± 0.073 Hz en condition A β o ; n=8 et fréquence moyenne : 2.74 ± 0.38 Hz en condition β -seci, A β o ; n=12 ; $p = 0.77$; **Figure 2 C, D**), la réduction de l'amplitude des sIPSCs induite par l'A β o était

abolie (amplitude moyenne : 6.01 ± 0.34 pA en condition $A\beta_0$; $n=9$ et amplitude moyenne : 10.27 ± 0.38 pA en condition β -seci, $A\beta_0$; $n=12$; $p=0.0005$; **Figure 2 C, D**). Ces données démontrent que les perturbations de la neurotransmission GABAergique induites par l' $A\beta_0$ nécessitent également le clivage de l'APP.

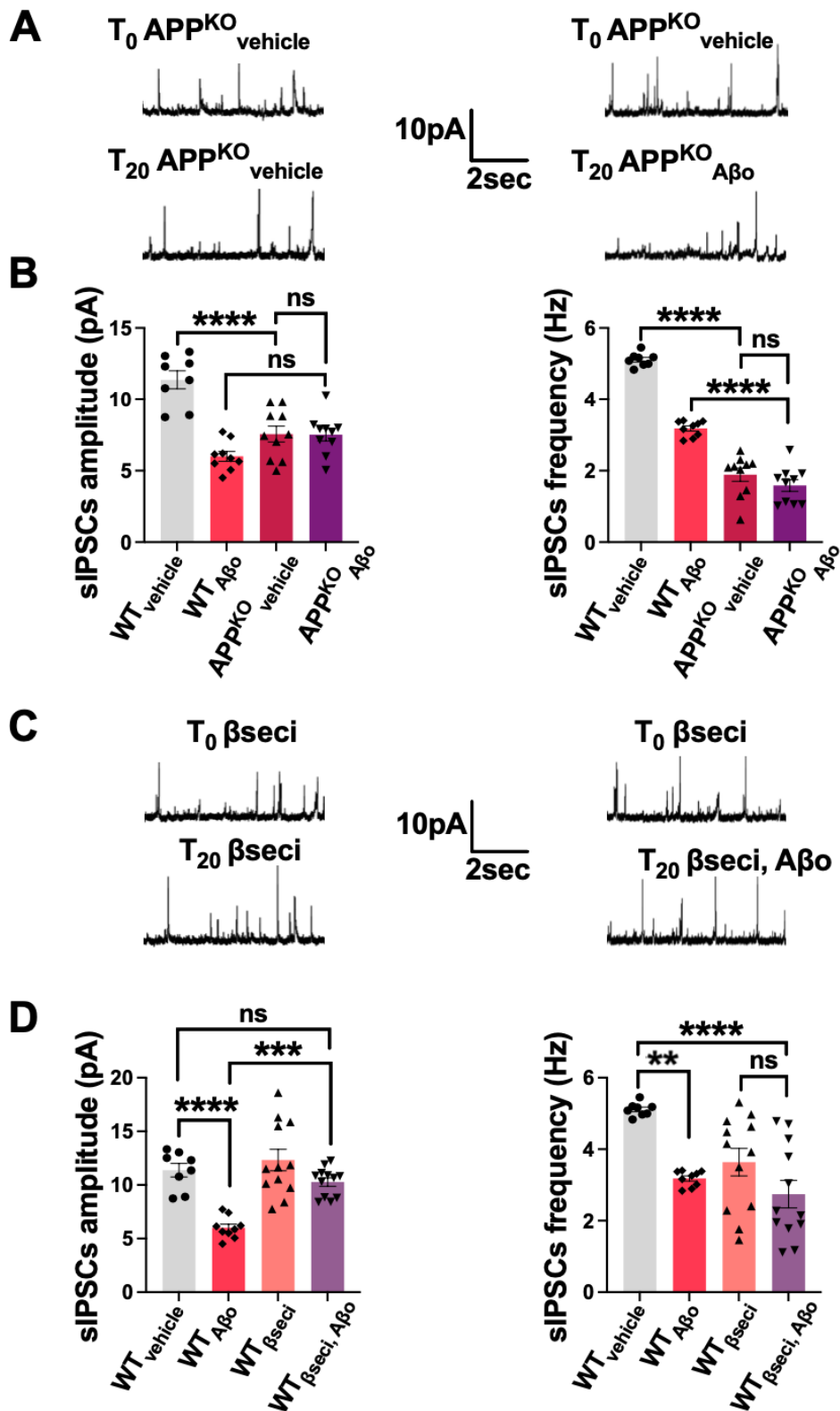


Figure 2 : Le clivage de l'APP est nécessaire aux modifications de la neurotransmission inhibitrice médiées par l'A β .

A, Traces représentatives des sIPSCs enregistrées dans les neurones pyramidaux CA1 à partir de tranches de souris APP^{KO}. Les traces ont été extraites au début de l'expérience (T0 APP^{KO}_{véhicule}, panneau gauche) et après 20 min (T20 APP^{KO}_{véhicule}, panneau gauche) ou au début de l'expérience (T0 APP^{KO}_{véhicule}, panneau droit) et 20 min après la perfusion d'A β (T20 APP^{KO}_{A β} , panneau droit).

B, Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrées à T20 dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT perfusées avec le véhicule (WT_{véhicule}, barres grises, n = 8 neurones) ou perfusées avec l' A β (WT_{A β} , barres rouges, n = 9 neurones) et dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris APP^{KO} perfusées avec le véhicule (APP^{KO}_{véhicule}, barres rouge foncé, n = 10 neurones) et perfusées avec l'A β (APP^{KO}_{A β} , barres violettes, n = 10 neurones).

C, Traces représentatives des sIPSCs enregistrées dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT traitées avec un inhibiteur de la β -sécrétase (β -seci, 1 μ M) et perfusées ou non avec de l'A β . Les traces ont été extraites au début de l'expérience (T0 WT _{β -seci}, panneau gauche) et après 20 min (T20 WT _{β -seci}, panneau gauche) ou au début de l'expérience (T0 WT _{β -seci}, panneau droit) et 20 min après la perfusion d'A β (T20 WT _{β -seci}, A β , panneau droit).

D, Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrées à T20 dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT perfusées avec le véhicule (WT_{véhicule}, barres grises, n = 8 neurones), ou avec l'A β (WT_{A β} , barres rouges, n = 9 neurones) et dans les neurones de tranches d'hippocampe de souris WT traitées avec β -seci (WT _{β -seci}, barres rouge clair, n = 12 neurones) ou traitées avec le β -seci avant la perfusion d'A β (WT _{β -seci}, A β , barres violettes, n = 12 neurones). ANOVA à un facteur et test post hoc de Tukey pour comparaisons multiples, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, ns : non significatif.

C. Clivage de l'APP et réduction de l'expression des co-transporteurs KCC2, un mécanisme à l'origine des dérégulations induites par l'A β

Des études menées par Chen et ses collaborateurs ont démontré que l'APP pouvait réguler, via une interaction protéine-protéine, l'expression du KCC2, un co-transporteur K⁺/Cl⁻ impliqué dans la régulation de l'inhibition médiée par les récepteurs GABA_A (M. Chen *et al.*, 2017).

A la vue de ces données, nous avons voulu savoir si l'augmentation du clivage de l'APP, décrite à la suite d'une exposition aux oligomères A β , peut affecter la

neurotransmission GABAergique en modifiant l'expression des KCC2. Pour cela, il a tout d'abord été question de confirmer l'interaction entre les KCC2 et l'APP. Des expériences de co-immunoprécipitation ont donc été effectuées à partir de lysats de tranches hippocampiques en utilisant des anticorps dirigés contre chaque protéine (**Figure 3 A, B**). Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons ensuite mesuré l'expression membranaire de l'APP et du KCC2. Des analyses Western blot ont été réalisés à la suite de fractionnements cellulaires de tranches d'hippocampe provenant de souris WT préalablement incubées 20 minutes avec l'A β . Nous avons découvert que l'expression membranaire des protéines APP et KCC2 était significativement réduite (niveau relatif de protéines APP : 0.2 ± 0.02 en condition véhicule ; n=6 et niveau relatif de protéines APP : 0.016 ± 0.005 en condition A β ; n=6 ; $p < 0.0001$; **Figure 3 C, D** ; niveau relatif de protéines KCC2 : 2.32 ± 0.15 en condition véhicule ; n=6 et niveau relatif de protéines KCC2 : 1.44 ± 0.08 en condition A β ; n=6 ; $p = 0.0004$; **Figure 3 E, F**).

Les niveaux totaux d'expression de KCC2 étaient également réduits après l'application d'A β , suggérant une dégradation subséquente du co-transporteur (niveau relatif de la protéine KCC2 : 2.17 ± 0.11 en condition véhicule ; n=7 et niveau relatif de la protéine KCC2 : 1.27 ± 0.13 en condition A β ; n=7 ; $p = 0.0002$; **Figure 3 G, H**). Enfin, la réduction des niveaux de KCC2 sous A β a été confirmée par immunofluorescence sur des neurones issus de cultures primaires d'hippocampe (intensité de fluorescence de KCC2 : 21.97 ± 1.45 en condition véhicule ; n=25 et intensité de fluorescence de KCC2 : 15.58 ± 1.11 en condition A β ; n=25 ; $p = 0.0010$; **Figure 3 I, J**).

Afin d'estimer les conséquences physiologiques de la réduction de KCC2 sur la transmission synaptique inhibitrice, nous avons étudié la relation courant/Voltage (I/V) des courants GABAergiques évoqués en stimulant les collatérales de Schaffer en configuration cellule entière et en présence de haute concentration intracellulaire de Cl⁻ (Doyon *et al.*, 2016; Mahadevan *et al.*, 2017). Cette expérience permet de définir le potentiel d'inversion GABAergique (E_{GABA}), qui d'après l'équation de Nernst, devrait être proche de -33.84 mV dans nos conditions expérimentales. Pour les tranches perfusées avec l'A β , nous avons constaté un déplacement de l' E_{GABA} vers des valeurs moins négatives. Cette potentialisation de l' E_{GABA} suggère une altération de l'équilibre

ionique cellulaire du Cl⁻ (E_{GABA} : -33.02 ± 1.7 mV en condition véhicule ; n=12 et -23.96 ± 0.73 mV en condition A β ; n=12 ; p<0,0001 ; **Figure 3 K, L, M**).

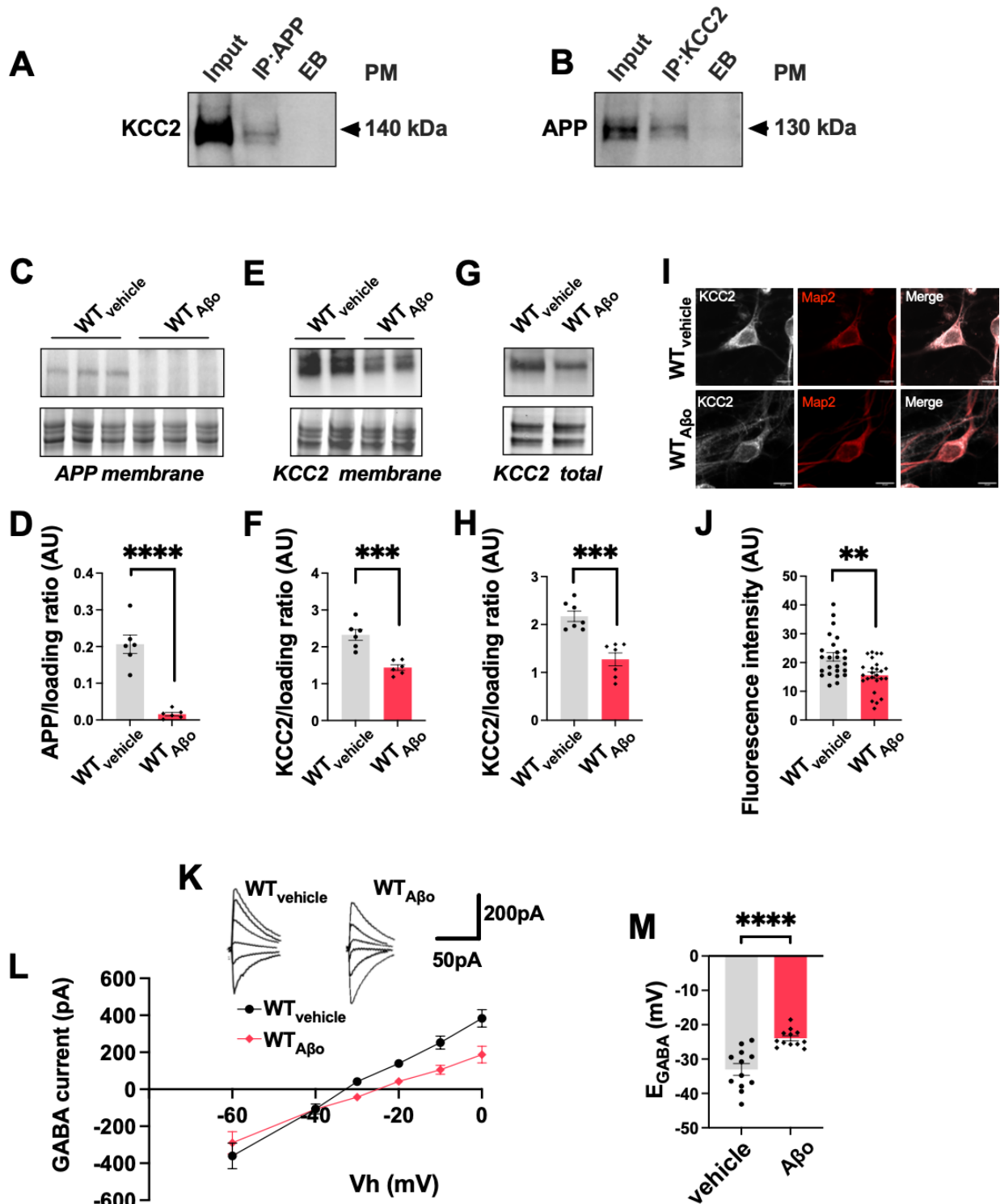


Figure 3 : L'application d'A β o réduit l'expression membranaire des protéines APP et KCC2 contribuant ainsi à la modification de l'E_{GABA} dans les neurones CA1 de l'hippocampe de souris WT.

A et B, Expérience de co-immunoprécipitation (IP) à partir de lysats hippocampiques de souris WT. Les Immunoblots montrent la détection de KCC2 après immunoprécipitation de l'APP (à gauche) et la détection de l'APP après immunoprécipitation de KCC2 (à droite). Des billes vides (EB) ont été utilisées comme contrôle négatif.

C, E et G, Immunoblots représentatifs d'extraits hippocampiques provenant de tranches hippocampiques de souris WT perfusées avec un véhicule ou avec l'A β o.

D, F et H, Quantification par immunoblot de l'APP membranaire (**D**), du KCC2 membranaire (**F**) et du KCC2 total (**H**) dans des tranches perfusées avec un véhicule ou avec l'A β o. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM dans la condition véhicule (WT_{véhicule}, barres grises) et dans la condition A β o (WT_{A β o}, barres rouges) pour l'APP membranaire : n=6 ; p < 0.0001, pour KCC2 membranaire n=6 ; p = 0.0004 et pour le KCC2 total : n = 7 ; p = 0.0002.

I, Micrographie en fluorescence confocale de neurones hippocampiques en culture provenant de souris WT après incubation avec un véhicule ou avec l'A β o.

J, Quantification de l'intensité de fluorescence des KCC2 dans les neurones incubés avec un véhicule ou avec l'A β o. Le graphique représente la moyenne \pm SEM dans la condition véhicule (WT_{véhicule}, barre grise, n = 25 neurones), et à la suite d'une application de 20 min d'A β o (WT_{A β o}, barre rouge, n = 25 neurones) ; p = 0.0010.

K, Traces d'échantillons montrant l'enregistrement par patch des eIPSCs (courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués par GABA) dans les neurones de tranches hippocampiques de souris WT perfusées avec un véhicule ou avec l'A β o.

L, Le graphique montre les courbes I/V moyennes \pm SEM pour les neurones enregistrés dans des tranches de souris WT perfusées avec un véhicule (WT_{véhicule}, cercles noirs, n = 12 neurones), avec l'A β o (WT_{A β o}, losanges noirs, n = 12 neurones).

M, Quantification de l'E_{GABA} dans les neurones de tranches hippocampiques de souris WT perfusées avec un véhicule ou avec l'A β o. Le graphique représente la moyenne \pm SEM dans la condition véhicule (WT_{véhicule}, barre grise, n = 12 neurones), dans la condition A β o (WT_{A β o}, barre rouge, n = 12 neurones). Tests t non appariés, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Pour confirmer que la réduction de l'expression des co-transporteurs KCC2 induite par l'A β o était dépendante de l'APP, nous avons évalué à la fois les niveaux de KCC2 et l'E_{GABA} dans les neurones hippocampiques de souris APP^{KO} traitées ou non avec l'A β o. Après quantification de la fraction membranaire du KCC2, nous avons pu constater que l'absence d'APP entravait la diminution de l'expression des KCC2 induite par l'A β o (niveau relatif de protéines KCC2 : 1.55 \pm 0.13 chez APP^{KO} ; n=6 et

niveau relatif de protéines KCC2 : 1.47 ± 0.10 chez $APP^{KO}_{A\beta}$; n=6 ; p=0.0020 ; **Figure 4 A, B**).

De même, aucune modification supplémentaire concernant l'expression totale de KCC2 ne s'est produite lorsque les tranches hippocampiques de souris APP^{KO} ont été perfusés avec la solution d' $A\beta$ (niveau relatif de protéines KCC2 : 1.48 ± 0.078 chez APP^{KO} ; n=7 et niveau relatif de protéines KCC2 : 1.46 ± 0.087 chez $APP^{KO}_{A\beta}$; n=7 ; p=0.99 ; **Figure 4 C, D**). En outre, nous avons noté un déplacement de l' E_{GABA} vers des valeurs plus dépolarisées dans les neurones de souris APP^{KO} par rapport aux WT (E_{GABA} : -33.02 ± 1.70 mV chez $WT_{véhicule}$; n=12 et -24.91 ± 2.14 mV chez $APP^{KO}_{véhicule}$; n=12 ; p=0.016, **Figure 4 E, F, G**) qui semble avoir occulté la dépolarisation de l' E_{GABA} médiée par $A\beta$ (E_{GABA} : -23.96 ± 0.73 mV chez $WT_{A\beta}$; n=12 et -24.55 ± 2.33 mV chez $APP^{KO}_{A\beta}$; n=12 ; p=0.99, **Figure 4 E, F, G**).

Enfin, pour approfondir la compréhension du mécanisme impliqué dans la réduction de KCC2, les tranches hippocampiques de souris WT ont été incubées avec β -seci pour empêcher le clivage de l'APP et les expressions membranaires des KCC2 et de l'APP ont été mesurées avec ou sans exposition à l' $A\beta$. Il est intéressant de noter que lorsque les tranches étaient prétraitées avec β -seci, les réductions de KCC2 et APP au niveau membranaire étaient abolies (niveau relatif de protéines KCC2 : 1.44 ± 0.07 en condition $A\beta$; n=6 et niveau relatif de protéines KCC2 : 2.38 ± 0.077 en condition β -seci, $A\beta$; n=6 ; p<0.0001 ; **Figure 4 H, I** ; niveau relatif de protéines APP : 0.016 ± 0.005 avec $A\beta$; n=6 et 0.18 ± 0.02 avec β -seci, $A\beta$; n=6 ; p=0.0002 ; **Figure 4 J, K**). Dans l'ensemble, nos données mettent en évidence l'implication du clivage de l'APP dans la diminution des KCC2 engendrée par l' $A\beta$ et la perturbation de la neurotransmission GABAergique.

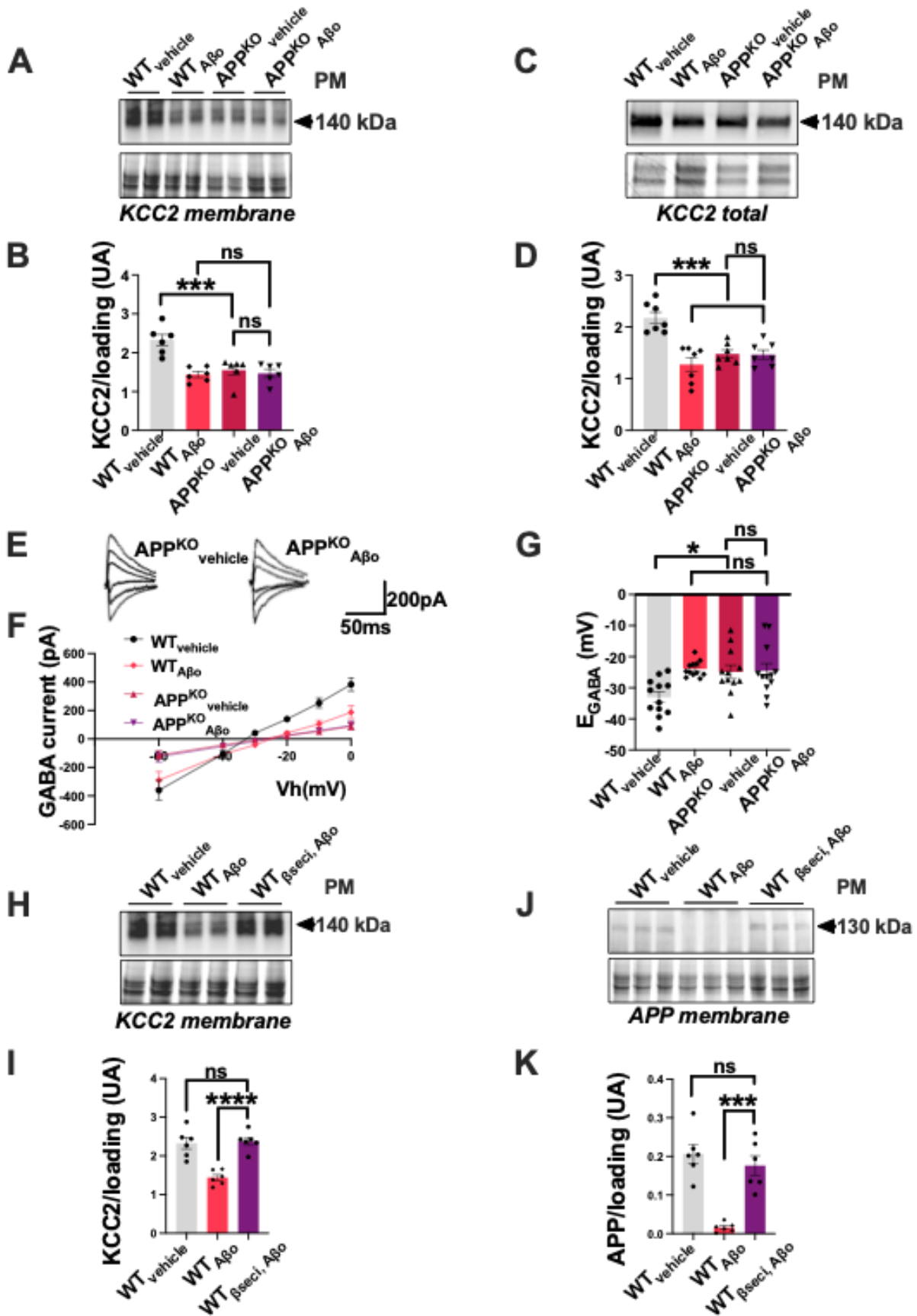


Figure 4 : Le clivage de l'APP est nécessaire pour la réduction des KCC2 générée par l'A β o dans les tranches hippocampiques de souris WT.

A et C, Immunoblots représentatifs d'extraits de tranches hippocampiques de souris WT ou APP^{KO} incubées avec un véhicule ou avec l'A β o.

B et D, Quantification par immunoblot des KCC2 membranaires (**B**) ou totaux (**D**) dans des tranches incubées avec un véhicule ou avec l'A β o. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM des tranches de souris WT (WT_{véhicule}, barres grises ; WT_{A β o}, barres rouges) et dans des tranches de souris APP^{KO} (APP^{KO}_{véhicule}, barres rouge foncé ; APP^{KO}_{A β o}, barres violettes) ; n = 6 souris en **B**, n = 7 souris en **D**.

E, Traces de l'enregistrement des eIPSCs (courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués) effectués dans les neurones CA1 de souris APP^{KO} incubées ou non avec l'A β o.

F, Le graphique montre les courbes I/V moyennes \pm SEM pour les neurones de souris WT (WT_{véhicule}, ronds noirs, n = 12 neurones ; WT_{A β o}, losanges rouges, n = 12 neurones) et de souris APP^{KO} (APP^{KO}_{véhicule}, triangles rouges, n = 12 neurones ; APP^{KO}_{A β o}, triangles inversés violets, n = 12 neurones).

G, Quantification de l'E_{GABA} dans les neurones de souris WT ou APP^{KO} incubées ou non avec l'A β o. Le graphique représente la moyenne \pm SEM dans les neurones de souris WT (WT_{véhicule}, barre grise, n = 12 neurones ; WT_{A β o}, barre rouge, n = 12 neurones) et dans les neurones de de souris APP^{KO} (APP^{KO}_{véhicule}, barre rouge foncé, n = 12 neurones ; APP^{KO}_{A β o}, barre violette, n = 12 neurones). **H et J**,

Immunoblots représentatifs d'extraits provenant de tranches hippocampiques de souris WT incubées avec un véhicule ou avec A β o, ou traitées avec un inhibiteur de la β -sécrétase (β -seci) avant incubation avec l'A β o.

I et K, Quantification par immunoblot de la fraction membranaire des KCC2 (**I**) ou de l'APP (**K**) provenant de tranches incubées ou non avec l'A β o, ou traitées avec β -seci avant incubation avec l'A β o. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM des tranches WT (WT_{véhicule}, barres grises, n = 6 souris ; WT_{A β o}, barres rouges, n = 6 souris) ou de tranches WT traitées avec β -seci avant incubation avec l'A β o WT _{β -seci}, A β o, barres violettes, n = 6 souris. ANOVA à un facteur et test post-hoc de Tukey pour comparaisons multiples, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0,0001, ns : non significatif.

II. Altération de la neurotransmission hippocampique chez les souris APP/PS1-21, modèle précoce de la maladie d'Alzheimer.

A. Modification de l'équilibre E/I chez les souris APP/PS1-21 âgées d'un mois

Dans la première partie de notre étude, une modification de l'équilibre E/I a été constatée à la suite d'une application exogène d'A β . Ces perturbations semblent être associées à une réduction significative de la transmission inhibitrice mettant en jeu l'APP et le KCC2. Afin de confirmer l'implication de ces deux protéines dans les altérations de la neurotransmission décrites au cours des phases précoces de la maladie d'Alzheimer, des enregistrements ont également été effectués chez APP/PS1-21 âgées d'un mois. Pour rappel, ce modèle murin de la maladie d'Alzheimer se caractérise par une production exacerbée du peptide A β humain dont l'augmentation est perceptible dès l'âge d'un mois. Comme indiqué à la **Figure 5**, à la suite d'enregistrements patch-clamp réalisés au niveau des cellules pyramidales de CA1, nous avons noté augmentation à la fois de l'amplitude et de la fréquence des sEPSCs chez les animaux APP/PS1-21 (amplitude moyenne : 8.84 ± 0.43 pA pour les WT, n=10 et amplitude moyenne : 13.16 ± 0.8 pA pour les APP/PS1 ; n=10 ; p=0.0002 et fréquence moyenne : 1.41 ± 0.15 Hz pour les WT, n=10 et fréquence moyenne : 2.55 ± 0.19 Hz pour les APP/PS1 ; n=10 ; p=0.0002 ; **Figure 5 A, B**).

En revanche, l'amplitude et la fréquence des sIPSCs étaient significativement diminuées (amplitude moyenne : 11.82 ± 0.81 pA pour les WT ; n=10 et 7.29 ± 0.39 pA chez les APP/PS1 ; n=10 ; p<0.0001 et fréquence moyenne : 4.71 ± 0.31 Hz pour les WT ; n=10 et 3.49 ± 0.31 Hz chez APP/PS1 ; n=10 ; p=0.012 ; **Figure 5 C, D**).

La comparaison du transfert de charge a révélé que les apports excitateurs (E) était augmentés à l'inverse des apports inhibiteurs (I) qui étaient réduits chez les souris APP/PS1 (E : $+26.26 \pm 2.91$ % et I : -30.78 ± 3.85 % chez APP/PS1 par rapport à WT), montrant une augmentation du ratio E/I chez les souris transgéniques similaire à celle observé après l'application d'A β (E/I : $+61.31 \pm 10.64$ % chez APP/PS1 par rapport à WT ; **Figure 5 E, F**).

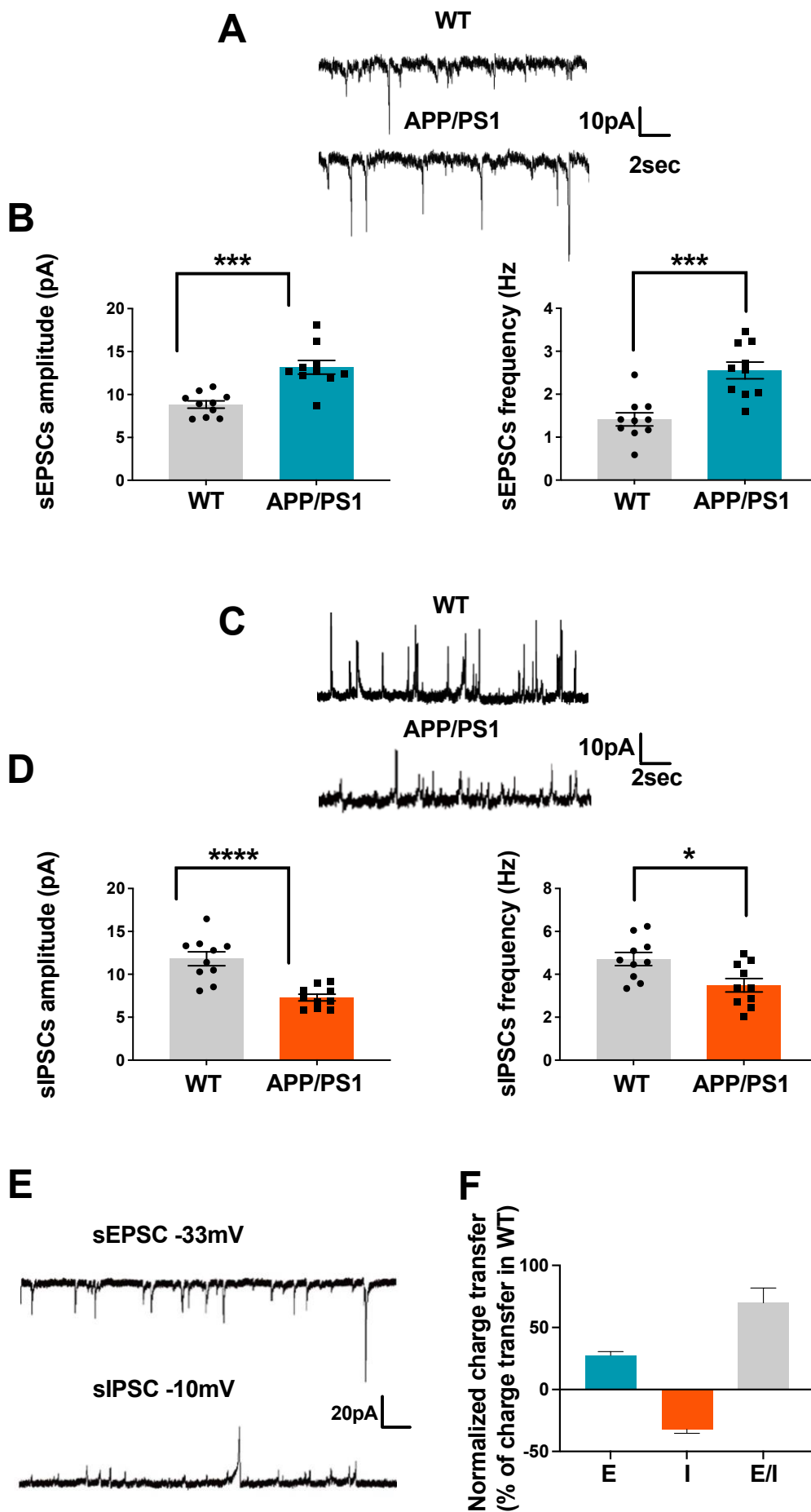


Figure 5 : Perturbation du ratio excitateur/inhibiteur au niveau des neurones pyramidaux de CA1 chez les souris APP/PS1-21 âgées d'un mois.

A, Traces représentatives des courants postsynaptiques excitateurs spontanés (sEPSCs) enregistrés à -33 mV dans des neurones pyramidaux de la région CA1 à partir de tranches hippocampiques de souris WT ou APP/PS1.

B, L'histogramme représente la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sEPSCs enregistrés dans les neurones de souris WT (WT, barre grise, n = 10 neurones) et de souris APP/PS1 (APP/PS1, barre orange, n = 10 neurones) p = 0.0002 pour l'amplitude et p = 0.0002 pour la fréquence des sEPSCs.

C, Traces représentatives des courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) enregistrés à +10 mV dans des neurones pyramidaux de la région CA1 à partir de tranches hippocampiques de souris WT ou APP/PS1.

D, Le graphique représente la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrés dans les neurones de souris WT (WT, barre grise, n = 10 neurones) et de souris APP/PS1 (APP/PS1, barre orange, n = 10 neurones). p < 0.0001 pour l'amplitude et p = 0.0122 pour la fréquence des sIPSCs.

E, Traces représentatives des sIPSCs et sEPSCs enregistrés dans le même neurone pyramidal de souris APP/PS1.

F Le graphique représente la valeur moyenne du transfert de charge mesurée dans les neurones pyramidaux de souris APP/PS1, normalisée par rapport à la valeur de transfert de charge mesurée chez les souris WT (E : afférences excitatrice/sEPSCs ; I : afférence inhibitrice/sIPSCs, E/I : barre gris clair; n = 10). Test t non apparié, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

B. Réduction de l'activité GABAergique et facilitation des processus de plasticité chez les souris APP/PS1-21

L'équilibre E/I est crucial pour maintenir une communication efficace au sein des réseaux neuronaux et soutenir les processus cognitifs tels que la mémoire et l'apprentissage. Afin d'établir si une augmentation du ratio E/I peut conduire à une dysfonction du réseau capable d'altérer les performances cognitives, nous avons étudié la potentialisation à long terme (LTP), un substitut cellulaire de la mémoire, dans la région CA1 de tranches hippocampiques de jeunes souris APP/PS1-21. Deux protocoles de plasticité ont été appliqués afin de générer une LTP. Les premières LTP ont été induites par le protocole de stimulation à haute fréquence (HFS-LTP), tandis

que les secondes ont été générées par le protocole de stimulation Thêta (TBS-LTP) dont les détails ont été abordés dans la partie Matériel et Méthodes de ce manuscrit.

Nous n'avons détecté aucune modification de la HFS-LTP dans les tranches APP/PS1 par rapport aux tranches WT (168.2 ± 14.72 % pour les souris WT ; n=8 et 152.8 ± 6.59 % chez les souris APP/PS1 ; n=8 ; p=0.77 ; **Figure 6 A, C**). En revanche, la TBS-LTP était significativement augmentée dans les tranches de cerveau des souris APP/PS1 par rapport aux souris WT (150.9 ± 6.94 % pour les WT ; n=8 et $201.4 \pm$ **Contrairement à la LTP induite par les stimulations Thêta, qui est généralement régulée et affaiblie par les apports inhibiteurs, la LTP induite par une stimulation à 100 Hz ne semble pas être modulée par la neurotransmission GABAergique (Chapman, Perez and Lacaille, 1998). Dans nos expériences, le blocage continu de l'inhibition avec de la picrotoxine (5 μ M), un antagoniste des récepteurs GABA_A, n'a eu aucun effet sur la HFS-LTP dans les deux groupes de souris (160.9 ± 15.46 % chez les souris WT ; n=8 et 146.4 ± 9.34 % chez les APP/PS1 ; n=8 ; p=0.82 ; **Figure 6 D, F**). Toutefois, suite à l'ajout de picrotoxine, la TBS-LTP a été augmentée chez les souris WT et atteint un niveau similaire à celui enregistré dans les tranches des souris APP/PS1 (212.6 ± 12.15 % chez les WT ; n=8 et 209.1 ± 9.48 % chez les souris APP/PS1 ; n=8 ; p=0.99 ; **Figure 6 E, F**).**

Ces données soulèvent la question de savoir si la potentialisation enregistrée à la suite de la TBS-LTP dans les tranches APP/PS1 résulte de perturbations de l'inhibition. Pour évaluer la contribution des apports inhibition à la TBS-LTP, nous avons mesuré les IPSC évoqués par la stimulation des collatérales de Schaeffer (eIPSC), avant et après le protocole TBS, en clampant la membrane du soma à +10 mV en utilisant le mode voltage-clamp (**Figure 6 G**) (Basu *et al.*, 2013). Dans la région CA1 des tranches de souris WT, l'eIPSC enregistré après l'application du protocole TBS était augmenté. En revanche, dans les tranches de souris WT incubées avec l'A β o (100 nM) ainsi que pour les tranches de souris APP/PS1, la potentialisation de l'eIPSC a été supprimée (131 ± 4.12 % chez les souris WT ; n=10 et 92.4 ± 5.47 % pour les APP/PS1 ; n=10, p<0.0001 et 91.54 ± 3.97 % en condition A β o, n=10 ; p<0.0001; **Figure 6 H, I, J**). Cela soutient l'idée que dans les tranches de souris APP/PS1, l'augmentation de la potentialisation obtenue à l'issue de la TBS-LTP est vraisemblablement liée à une perturbation des apports inhibiteurs.

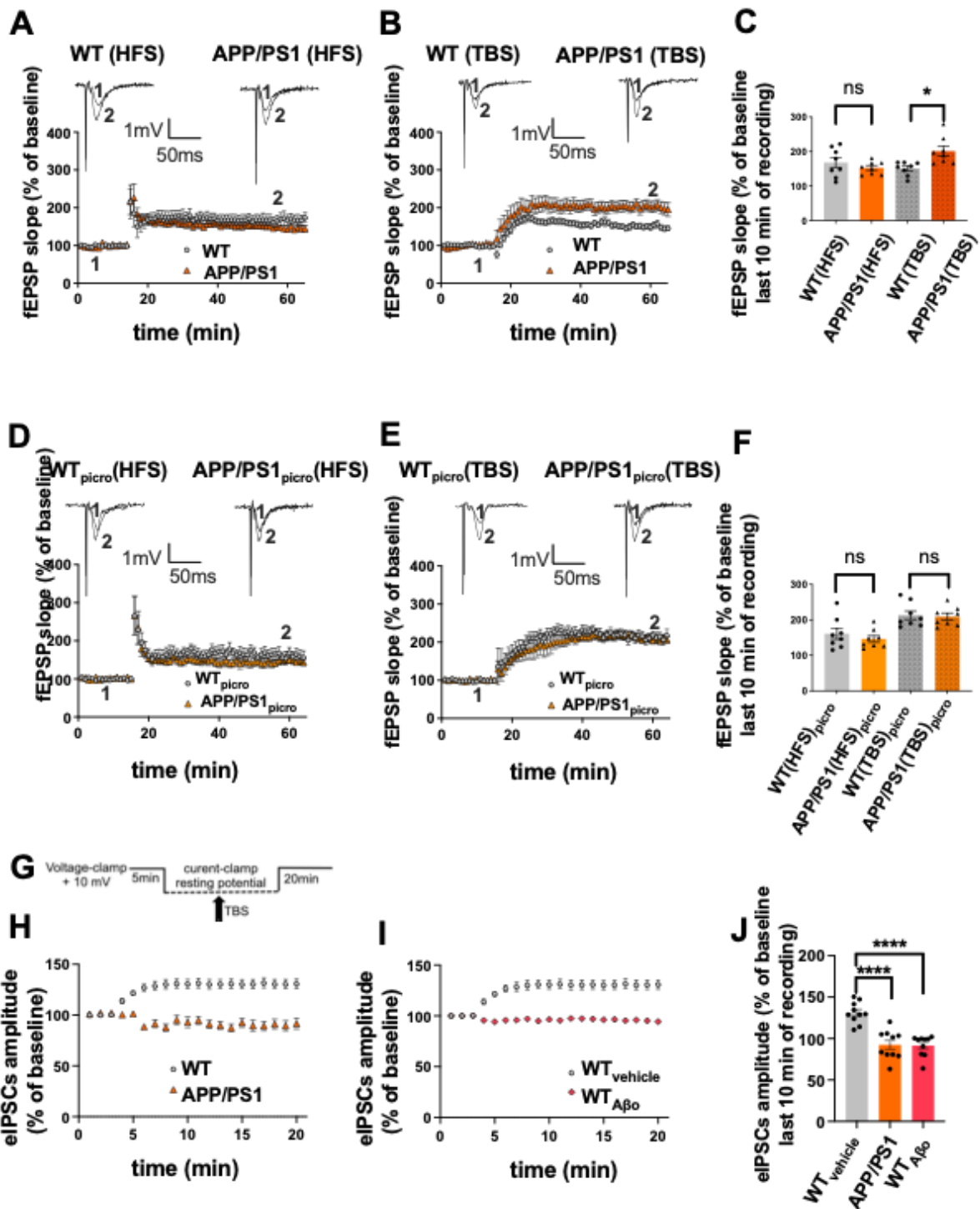


Figure 6 : La perturbation de la neurotransmission GABAergique conduit à une facilitation de la plasticité synaptique chez les souris APP/PS1 âgées d'un mois.

A et B, Les données représentent la moyenne (\pm SEM) de la pente des fEPSPs enregistrés dans la région CA1 de tranches hippocampiques de souris WT (cercles gris) ou de tranches hippocampiques de souris APP/PS1 (triangles oranges) après un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) (**A**) ou un protocole de stimulation

thêta (TBS) (**B**), exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs obtenue au cours de la ligne de base. Les traces représentatives d'une expérience sont montrées avant (**1**) et après (**2**) les protocoles de stimulation. Elles ont été extraites aux moments indiqués (**1, 2**) sur les graphiques.

C, Le graphique montre la moyenne (\pm SEM) de la pente des fEPSPs exprimée en pourcentage de la valeur de la ligne de base et mesurée au cours des 10 dernières minutes d'enregistrements dans les tranches de souris WT après HFS (WT(HFS), barre grise, n = 8 tranches), de souris APP/PS1 après HFS (APP/PS1(HFS), barre orange, n = 8 tranches), dans les tranches de souris WT après TBS (WT(TBS), barre grise pointillés, n = 8 tranches) et de souris APP/PS1 après TFS (APP/PS1(TFS), barre orange pointillés, n = 8 tranches).

D et E, Les données représentent la moyenne (\pm SEM) de la pente des fEPSPs enregistrés en présence de picrotoxine dans des tranches hippocampiques de souris WT (cercles gris) ou de souris APP/PS1 (triangles oranges) après le protocole HFS (**D**) ou TBS (**E**), exprimées en pourcentage de la pente des fEPSPs obtenu pendant la ligne de base. Les traces représentatives d'une expérience sont montrées avant (**1**) et après (**2**) la stimulation. Elles ont été extraites aux moments indiqués (**1, 2**) sur les graphiques.

F, Le graphique montre la moyenne (\pm SEM) de la pente des fEPSPs exprimée en pourcentage de la valeur de la ligne de base et mesurée au cours des 10 dernières minutes d'enregistrements dans des tranches de souris WT après HFS (WT_{picro}(HFS), barre grise, n = 8 tranches), de souris APP/PS1 après HFS (APP/PS1_{picro}(HFS), barre orange, n = 8 tranches), dans des tranches de souris WT après TBS (WT_{picro}(TBS), barre grise pointillés, n = 8 tranches) et de souris APP/PS1 après TBS (APP/PS1_{picro}(TBS), barre orange pointillés, n = 8 tranches).

G, Ce schéma illustre les étapes permettant l'enregistrement des IPSCs évoqués par stimulation des collatérales de Schaffer en mode voltage-clamp avant et après le protocole de TBS.

H et I, Les données représentent la moyenne (\pm SEM) de l'amplitude des eIPSCs enregistrés dans des neurones CA1 de souris WT (cercles gris) ou de souris APP/PS1 (triangles oranges) (**H**) et dans des neurones CA1 de souris WT (cercles gris) ou de souris WT incubés avec A β pendant 20 min (losanges rouges) (**I**), exprimée en pourcentage de l'amplitude des eIPSCs obtenu pendant la ligne de base.

J, L'histogramme montre la moyenne (\pm SEM) de l'amplitude des eIPSCs exprimée en pourcentage de la valeur de la ligne de base et mesurée au cours des 10 dernières minutes d'enregistrements chez des souris WT (WT_{vehicle}, barre grise, n = 10 neurones), des souris APP/PS1 (APP/PS1, barre orange, n = 10 neurones) et chez des souris WT perfusées avec l'A β (WT_{A β} , barre rouge, n = 10 neurones). ANOVA à un facteur et test post hoc de Tukey pour comparaisons multiples, *p < 0.05, ****p < 0,0001, ns : non significatif.

III. Rétablissement de la balance E/I après restauration pharmacologique de la fonction et de l'expression des KCC2

Pour remédier aux déficits de la neurotransmission inhibitrice causées par la diminution de l'expression des KCC2, nous avons tenté de restaurer pharmacologiquement la capacité d'extrusion du chlore en augmentant à la fois l'expression et la fonction des KCC2 en utilisant le CLP257 et le CLP290 (Gagnon *et al.*, 2013). Ainsi, nous avons montré que le prétraitement des tranches d'hippocampe avec CLP257 à 100 μ m empêchait la réduction de l'expression de KCC2 induite par l'application de 100 nM d'A β o (niveau relatif de protéines KCC2 : 1.27 ± 0.13 pour les WT_{A β o} ; n=7 et niveau relatif de protéines KCC2 : 1.86 ± 0.15 chez les WT_{CLP257}, A β o ; n=7 ; p=0,03 ; **Figure 7 A, B**).

Nous avons ensuite évalué si la restauration de l'expression des KCC2 était suffisante pour renverser les modifications de l'E_{GABA} déclenchées par l'A β o. Les neurones provenant de tranches prétraitées avec CLP257 et perfusés avec l'A β o présentait un E_{GABA} plus hyperpolarisé que les neurones perfusés uniquement avec la solution d'oligomères, mais similaire à celui des neurones uniquement incubés avec CLP257 (E_{GABA} : -23.43 ± 1.08 mV chez WT_{A β o} ; n=11 et E_{GABA} : -28.91 ± 0.73 mV chez les WT_{CLP257}, A β o ; n=11, p=0.014 ; E_{GABA} : -28.97 ± 1.30 mV pour les WT_{CLP257} ; n=11 et E_{GABA} -28.91 ± 0.73 mV chez les WT_{CLP257}, A β o ; n=11, p>0,9999 ; **Figure 7 C, D**).

Puisque la perturbation de l'équilibre E/I a également été observée chez les souris APP/PS1-21, nous avons décidé de mesurer à la fois l'expression de KCC2 et l'E_{GABA} dans les neurones de tranches d'hippocampe provenant de ces souris transgéniques. De façon similaire aux effets précédemment décrits sur les tranches de souris WT perfusées avec l'A β o, nous avons remarqué une diminution de l'expression totale des KCC2 associée à une dépolarisation significative de l'E_{GABA} (niveau relatif de protéines KCC2 : 0.81 ± 0.04 chez les WT ; n=12 et niveau relatif de protéines KCC2 : 0.60 ± 0.03 chez les souris APP/PS1 ; n=12 ; p=0,02 ; E_{GABA} : -31.90 ± 0.93 mV pour les WT ; n=16 et E_{GABA} : -22.29 ± 1.40 mV pour les souris APP/PS1-21 ; n=16, p=0,0001 **Figure 7 E, F, G, H**).

Par conséquent, nous avons ensuite voulu étudier les effets de l'administration intrapéritonéale de CLP290, un composé carbamate dérivé du CLP257, sur les perturbations de la transmission inhibitrices mis en évidence chez les souris APP/PS1. Pour cela, des injections quotidiennes ont été effectuées pendant 7 jours à partir du 15^{ème} jour postnatal, début de la surproduction d'A β . Le traitement ainsi administré a permis de restaurer l'expression totale des KCC2 dans l'hippocampe des souris APP/PS1-21 (niveau relatif de protéines KCC2 : 0.60 ± 0.03 chez les APP/PS1 ; n=12 et niveau relatif de protéines KCC2 : 0.82 ± 0.06 chez APP/PS1_{CLP290} ; n=12 ; p=0,03 ; **Figure 7 E, F**). L'E_{GABA} mesuré dans les neurones d'animaux transgéniques a également été normalisé par le traitement avec CLP290 (E_{GABA} : -22.29 ± 1.41 mV chez les APP/PS1 ; n=16 et E_{GABA} : -28.85 ± 1.09 mV pour les APP/PS1_{CLP290} ; n=16, p=0,04 ; **Figure 7 G, H**).

Enfin, nous avons évalué si les traitements avec le CLP257 et le CLP290 pouvaient finalement prévenir les perturbations du rapport E/I. De manière intéressante, la mesure du transfert de charge a indiqué que les deux traitements CLP257 et CLP290 ont permis de rétablir le rapport E/I à la fois dans les tranches de souris WT perfusées avec l'A β o mais aussi dans les tranches de souris injectées APP/PS1-21 respectivement (rapport E/I : 61.53 ± 5.76 % pour les souris WT_{A β o} ; n=10 et rapport E/I : -3.70 ± 4.85 chez les WT_{CLP257, A β o} ; n=10 ; p<0,0001 ; rapport E/I : 33.40 ± 7.54 % chez les souris APP/PS1 ; n=23 et rapport E/I : -3.52 ± 4.052 mV pour les APP/PS1_{CLP290} ; n=25 ; p<0,0001 ; **Figure 7 J**).

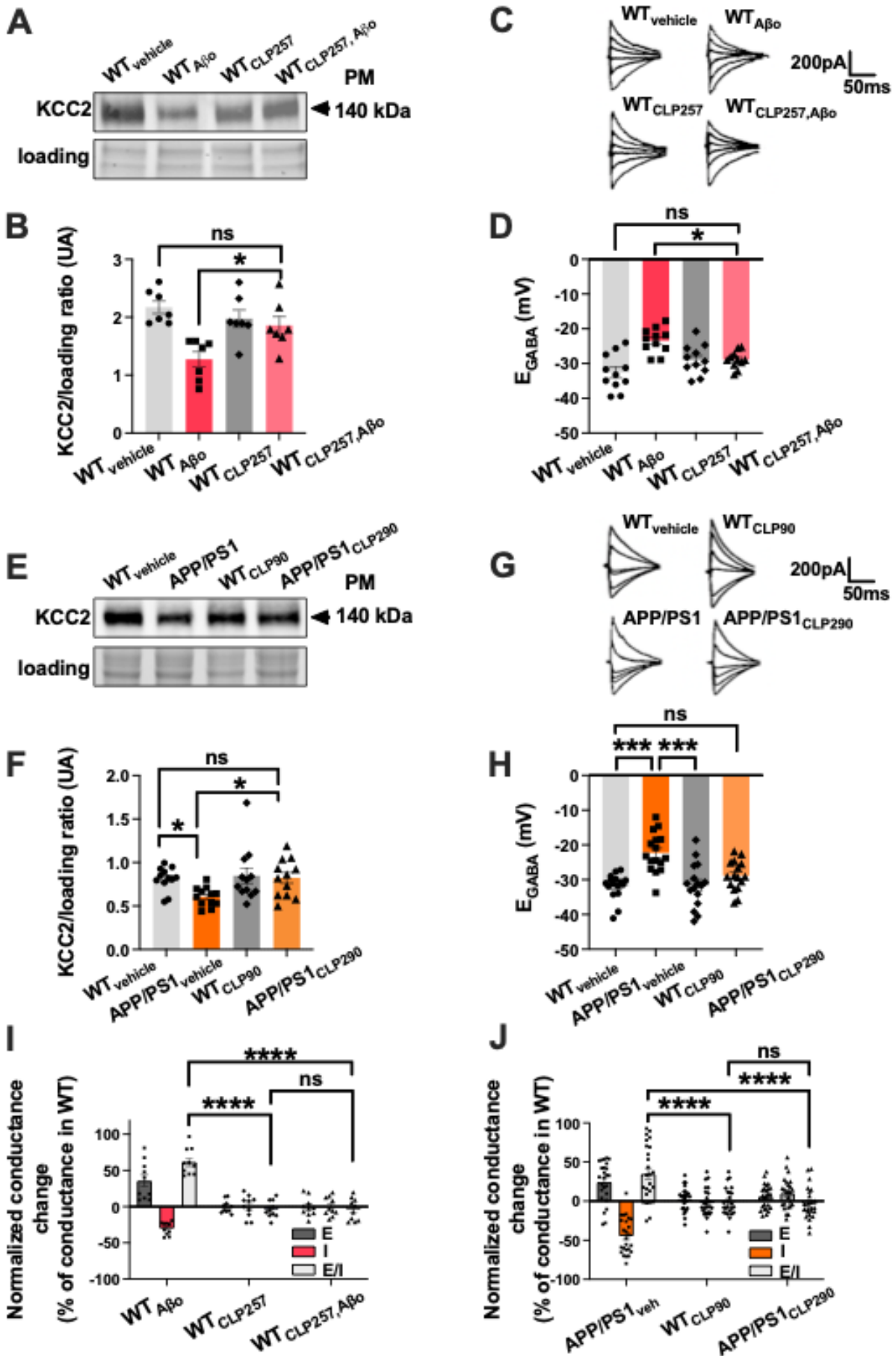


Figure 7 : L'augmentation de l'expression et de la fonction de KCC2 restaure l'E_{GABA} et le ratio E/I dans l'hippocampe.

A et E, Immunoblots représentatifs des lysats hippocampiques de tranches de souris WT incubées avec le véhicule, l'A β , le CLP257 ou traitées avec du CLP257 avant d'être incubées avec de l'A β (**A**) et de tranches de souris WT ou APP/PS1 injectées avec le véhicule ou le CLP290 (**E**).

B, Quantification par immunoblots du KCC2 total dans les tranches incubées avec les différents traitements. Le graphique montre la moyenne \pm SEM pour les tranches de souris WT incubées avec le véhicule ou l'A β et traitées ou non avec le CLP257 (WT_{véhicule}, barre grise, n = 7 ; WT_{A β} , barre rouge, n = 7 ; WT_{CLP257}, barre gris foncé, n = 7 et WT_{CLP257}, A β , barre rouge clair, n = 7).

C et G, Traces d'enregistrements eIPSCs dans des neurones de tranches hippocampiques de souris WT ou APP/S1 incubées avec les différents traitements.

D, Quantification de l'E_{GABA} dans des neurones de tranches de souris WT incubées avec le véhicule ou l'A β et traitées ou non avec le CLP257 (WT_{véhicule}, barre grise, n = 11 ; WT_{A β} , barre rouge, n = 11 ; WT_{CLP257}, barre gris foncé, n = 11 et WT_{CLP257}, A β , barre rouge clair, n = 11).

F, Quantification par immunoblots du KCC2 total dans des tranches hippocampiques de souris WT ou APP/PS1 injectées avec le véhicule ou le CLP290. Le graphique montre la moyenne \pm SEM pour les tranches de souris WT ou APP/PS1 (WT_{véhicule}, barre grise, n = 12 ; APP/PS1_{véhicule}, barre orange, n = 12 ; WT_{CLP290}, barre gris foncé, n = 12 et APP/PS1_{CLP290}, barre orange clair, n = 12).

H, Quantification de l'E_{GABA} dans des neurones de souris WT et APP/PS1 (WT_{véhicule}, barre grise, n = 16 ; APP/PS1_{véhicule}, barre orange, n = 16 ; WT_{CLP290}, barre gris foncé, n = 16 et APP/PS1_{CLP290}, barre orange clair, n = 16).

I, Le graphique montre la moyenne \pm SEM du transfert de charge mesuré dans les neurones de tranches de souris WT incubées ou non avec l'A β , traitées ou non avec le CLP257 (WT_{A β} , n = 10 ; WT_{CLP257}, n = 10 neurones ; WT_{CLP257}, A β , n = 10 neurones) et normalisée à la valeur du transfert de charge mesuré chez les souris WT perfusées avec le véhicule (E : apports excitateurs/sEPSCs (barre gris foncé) ; I : apports inhibiteurs/sIPSCs (barre grise), E/I : (barre gris clair).

J, Le graphique montre la moyenne \pm SEM du transfert de charge mesuré dans les neurones de souris WT et APP/PS1 injectées avec le véhicule ou le CLP290 (APP/PS1_{veh}, n = 23 ; WT_{CLP290}, n = 25 et APP/PS1_{CLP290}, n = 25) et normalisée par la valeur du transfert de charge mesuré chez les souris WT injectées avec le véhicule (E : apports excitateurs/sEPSCs (barre gris foncé) ; I : apports inhibiteurs/sIPSCs (barre colorée), E/I : (barre gris clair)). **Figure 7 A, B, I et J** : ANOVA à un facteur et test post-hoc de Tukey pour comparaisons multiples. **Figure 7 F et H** : Test de Kruskal-Wallis et test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples. *p <0.05, ***p <0.001, ****p <0.0001, ns = non significatif. Immunoblots, n= nombre de souris ; enregistrements électrophysiologiques, n =nombre de neurone.

Discussion

Discussion

La régulation de nombreux processus physiologiques et cognitifs repose sur un équilibre précis entre les systèmes excitateur et inhibiteur qui est essentiel pour le fonctionnement des circuits neuronaux (Palop *et al.*, 2007). Les perturbations de la balance E/I ont été associées à divers troubles mnésiques et constituent désormais un domaine de recherche en pleine expansion dans l'étude des pathologies neurologiques. Au cours des phases précoces et asymptomatiques de la maladie d'Alzheimer (MA), de nombreuses études ont montré que les oligomères solubles β -amyloïde ($A\beta$) pouvaient perturber cet équilibre E/I et ainsi participer au maintien d'un état hyperactif (Busche *et al.*, 2008; Palop and Mucke, 2016; Paumier *et al.*, 2022). Des données récentes rapportent que les effets délétères de l' $A\beta$ sur la transmission glutamatergique seraient dépendants de sa liaison à la synapse, via une interaction physique avec la protéine APP (Rolland *et al.*, 2020).

Parallèlement, des altérations de la transmission GABAergique, élément central de la régulation de l'équilibre excitation/inhibition (E/I), ont été observées dans plusieurs modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Wang *et al.*, 2014; Martinez-Losa *et al.*, 2018). Fait intéressant, certaines études suggèrent que l'APP pourrait également contribuer à ces perturbations inhibitrices en influençant l'expression du transporteur de chlore KCC2 (Chen *et al.*, 2017).

Les recherches menées au cours de ma thèse ont révélé une altération de la balance E/I, un phénomène associé à la surproduction précoce d' $A\beta_0$ et en partie imputable à une réduction importante de la neurotransmission inhibitrice dans l'hippocampe. Les expériences effectuées ont permis de montrer que ce déficit GABAergique pourrait être lié à une augmentation pathologique du clivage de l'APP et à la réduction de l'expression du co-transporteur de chlore KCC2 qui en résulte. Enfin, les données obtenues suggèrent qu'un traitement pharmacologique augmentant la fonction et l'expression de ces co-transporteurs permettrait de restaurer l'équilibre E/I en prévenant les perturbations de la neurotransmission GABAergique hippocampique tant chez les souris WT que dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.

I Perturbation de l'équilibre E/I et les protéines impliquées

A. Altération de la transmission inhibitrice et APP

Dans la première partie de l'étude décrite dans ce manuscrit, l'objectif a d'abord été d'établir un bilan global de la transmission neuronale hippocampique afin de caractériser les modifications précoces de l'équilibre E/I induites par les oligomères A β . Les premiers enregistrements électrophysiologiques ont souligné la présence d'une activité excitatrice exacerbée, observable après l'application exogène d'A β , et également chez les souris APP/PS1-21. Pour rappel, cet état hyperactif a été caractérisé dans l'hippocampe de patients au stade MCI et d'un point de vue clinique, il constitue, à ce jour, l'un des biomarqueurs utilisés dans le diagnostic des phases précoces de la maladie. De façon intéressante, conjointement à cette hyperactivité, nos résultats ont mis en évidence une réduction importante de la fréquence et de l'amplitude de l'activité inhibitrice, phénomène se traduisant par une augmentation significative du ratio E/I. Des perturbations similaires de la neurotransmission ont été décrites chez d'autres modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Palop and Mucke, 2016).

Les altérations de la transmission GABAergique et leur contribution potentielle à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA) sont désormais largement reconnues et font actuellement l'objet de nombreuses recherches. À cet égard, les travaux de Busche *et al.* (2008), menés chez les souris APP23XPS45, suggèrent que l'hyperactivité observée dans les circuits corticaux serait davantage attribuable à une diminution des apports inhibiteurs qu'à une augmentation de la transmission glutamatergique (Busche *et al.*, 2008). De manière complémentaire, une étude plus récente menée par Verret *et al.* (2012) a montré que le dysfonctionnement du réseau et les déficits de mémoire observés chez les souris hAPP20J pourraient découler d'une réduction significative du nombre d'interneurones, en particulier des cellules exprimant la parvalbumine (PVs) (Verret *et al.*, 2012). Enfin, une publication parue en 2016 a révélé qu'un dysfonctionnement des interneurones exprimants la somatostatine serait impliqué dans les altérations mnésiques observées chez des souris APP/PS1- Δ 9 (Schmid *et al.*, 2016).

Au regard de ces données, nous avons concentré notre étude sur les modifications de la transmission inhibitrice et les mécanismes pathologiques amyloïdogéniques associés. En nous appuyant sur des travaux antérieurs montrant que l'A β o était capable d'augmenter le clivage de l'APP, nous nous sommes interrogés sur la mise en jeu de cette protéine dans les modifications de la transmission GABAergique précédemment décrites. Les courants inhibiteurs enregistrés sur les tranches d'hippocampe de souris APP^{KO} ou en présence d'inhibiteur de la β -sécrétase sont restés inchangés malgré l'application d'A β o. Si ces résultats sembleraient confirmer notre hypothèse quant à l'implication de l'APP dans les perturbations inhibitrices, son clivage apparaît lui aussi nécessaire.

Bien que notre étude n'ait pas directement évalué cette question, il serait pertinent d'examiner les mécanismes par lesquels l'A β o pourrait influencer le clivage de l'APP. Les travaux de Gleeson et son équipe ont abordé ce sujet, révélant que la présence d'A β perturberait l'activité des protéines d'adressage endosomal Arl5b et AP4. Cela entraînerait une accumulation de l'APP au niveau de l'appareil de Golgi, où elle subirait un clivage exacerbé (Toh *et al.*, 2017; Tan and Gleeson, 2019). Cependant, ces conclusions ont été réévaluées dans une étude d'Antonio *et al.* (2022), qui suggère qu'en présence d'A β , l'augmentation du clivage de l'APP se produirait principalement dans le compartiment endosomal, suite à l'activation de la protéine Gao et de sa sous-unité G β γ . Cette activation favoriserait l'interaction entre l'APP et la β -sécrétase, contribuant ainsi à l'accumulation intracellulaire d'A β (Antonino *et al.*, 2022).

Bien que ces deux mécanismes soient plausibles au regard de nos résultats, les travaux menés au sein de l'équipe, par Marta Rolland, semblent appuyer l'hypothèse de Gleeson, ayant démontré une accumulation accrue de l'APP au niveau de l'appareil de Golgi (Rolland *et al.*, 2020). Néanmoins, l'hypothèse d'un clivage aberrant dans le compartiment endosomal ne peut être écartée. Il serait donc important d'examiner à la fois le rôle des protéines Arl5b et AP4, ainsi que celui de la protéine Gao, afin de mieux comprendre comment l'A β favorise le clivage de l'APP.

Compte tenu des résultats obtenus sur les tranches de souris APP^{KO} confirmant la mise en jeu de l'APP, nous avons voulu déterminer comment cette protéine pouvait influencer la transmission inhibitrice. Si comme nos résultats le suggèrent, les effets observés sont associés à son clivage, alors plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

La première serait de considérer les fragments issus du clivage comme éléments centraux des perturbations inhibitrices, en particulier l'APP soluble (sAPP), fragment produit à la suite du clivage par la β -sécrétase. L'influence du sAPP sur l'activité neuronale a été largement étudiée dans le cadre de la MA (Mockett *et al.*, 2017; Müller, Deller and Korte, 2017). Dans une étude parue en 2019, Rice et son équipe ont découvert l'existence d'une interaction protéique entre le fragment sAPP et la sous-unité 1a des récepteurs métabotropiques présynaptiques GABA_B (GABA_BR1a). De façon intéressante, leurs résultats ont montré que la fixation entre le récepteur et le sAPP pouvait inhiber la libération des vésicules présynaptiques et ainsi entraîner une réduction drastique de la transmission inhibitrice et de la facilitation à court terme (Rice *et al.*, 2019). D'après ces données, l'augmentation du clivage de l'APP médié par l'A β o pourrait donc participer à la diminution des sIPSC en favorisant l'interaction entre le fragment sAPP et les GABA_BR1a.

Afin d'étudier la contribution de ce mécanisme présynaptique dans la réduction pathologique des courants inhibiteurs analysés, des courants inhibiteurs miniatures (mIPSCs) ont été enregistrés en présence de TTX ([Figure Annexe 1](#)). Les mIPSCs fournissent des informations sur l'activité synaptique basale et notamment la probabilité de libération des neurotransmetteurs en isolant les contributions présynaptiques et postsynaptiques. En présence d'A β o, les résultats ont montré une réduction de l'amplitude des mIPSCs sans changement de fréquence suggérant des modifications principalement localisées au niveau postsynaptique.

Par ailleurs, la contribution des récepteurs GABA_B a aussi été évaluée. Pour cela, des sIPSCs ont été enregistrés en présence de saclofen, un antagoniste des GABA_B. L'absence de changement semble indiquer que les sIPSC enregistrés dans nos conditions expérimentales ne sont que très peu affectés par l'activation des GABA_B. Bien que leur contribution ne puisse pas être exclue, nos résultats actuels ne

permettent pas d'établir un lien entre les fragments sAPP et les perturbations de la transmission inhibitrices observées.

En s'intéressant à la forme membranaire de l'APP, les chercheurs ont identifié de nombreuses protéines essentielles au maintien de l'activité inhibitrice et dont la fonction est régulée par leur interaction avec l'APP (Chen *et al.*, 2017; Petrache *et al.*, 2020). Il est donc possible qu'en présence d'A β , la diminution de l'APP membranaire observée puisse perturber l'activité inhibitrice en altérant les fonctions cellulaires associées aux protéines avec lesquelles l'APP interagit.

Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Chen *et al.* (2017) qui ont révélé la mise en jeu de l'APP dans la régulation du co-transporteur de chlore KCC2 et souligné l'importance de cette interaction dans la régulation de l'activité GABAergique. En conséquence, nous avons vérifié si l'augmentation du clivage de l'APP, subséquente à une exposition aux oligomères A β , pouvait affecter la neurotransmission inhibitrice en modifiant l'expression des KCC2.

Les mesures recueillies semblent valider cette hypothèse puisqu'une diminution de l'expression des KCC2 totaux et membranaires a effectivement été observée après l'application d'A β . En revanche, aucun changement n'a été détecté à la suite de la perfusion d'A β chez les souris APP^{KO} ou lorsque l'activité de la β -sécrétase était bloquée chez les animaux WT.

Enfin, la potentialisation de l'E_{GABA}, résultant de la réduction notable des KCC2, a permis de confirmer le rôle crucial de ces co-transporteurs dans les perturbations inhibitrices initiées par les oligomères.

Les travaux récemment publiés par Keramidis *et al.* (2023) ont décrit une réduction comparable concernant l'expression totale et membranaire des KCC2 de la région CA1 chez des souris modèle 5XFAD âgées de deux et quatre mois (l'expression des KCC2 à un mois n'a pas été évaluée) (Keramidis *et al.*, 2023). À l'instar de nos observations chez le modèle APP/PS1-21, la diminution des KCC2 s'est manifesté par une modification de l'homéostasie du chlore qui était cependant plus tardive chez les souris 5XFAD.

En dehors de ces résultats, il paraît également intéressant d'évoquer la diminution significative de l'expression total des KCC2 chez les souris APP^{KO} en

comparaison des animaux WT. Ces résultats semblent concorder avec les données de la littérature et confirmeraient le rôle essentiel de l'APP dans la stabilisation membranaire du co-transporteur. Par ailleurs, la réduction du niveau des KCC2 pourrait également expliquer la potentialisation de l' E_{GABA} chez les souris APP^{KO} ainsi que la diminution des courants inhibiteurs enregistrés dans ce modèle.

B. Interaction APP/KCC2, acteur central des perturbations GABAergiques

Dans l'ensemble, nos données expérimentales convergent vers un mécanisme dans lequel l'interaction entre l'APP et les KCC2 semblent jouer un rôle de premier plan dans les perturbations précoces de la transmission inhibitrice médiées par l'A β o (Figure 8).

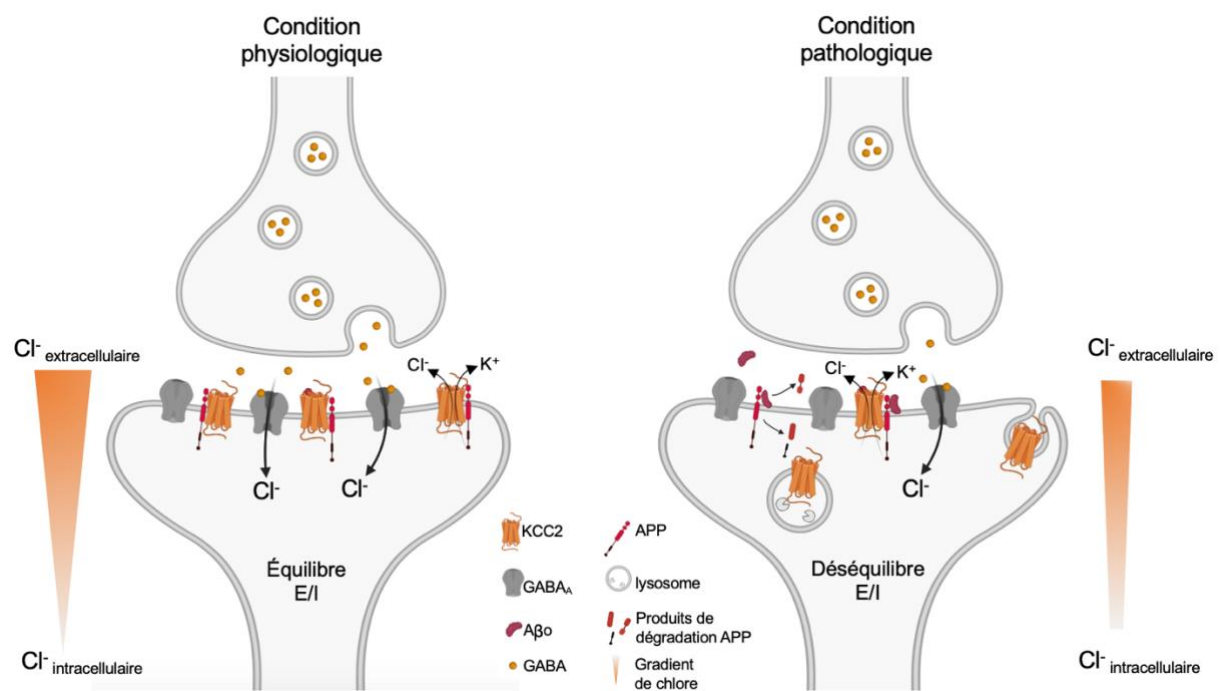


Figure 8 : Mécanisme hypothétique de la diminution de l'interaction KCC2/APP et des perturbations GABAergiques associées (schéma réalisé sur BioRender.com). Les résultats obtenus ont montré qu'en réponse à l'application d'A β o, une diminution importante de l'expression total et membranaire des KCC2 était observée. Cette réduction, dépendante du clivage de l'APP, pourrait être due à une augmentation du nombre de KCC2 non associés à l'APP, entraînant leur dégradation via l'activation de la voie lysosomal

Bien que nos résultats ne permettent pas, à ce stade, d'identifier les processus exacts impliqués dans ces modifications, la réduction concomitante de l'expression

membranaire et totale des KCC2, observée à la suite de la perfusion d'A β , suggère que le clivage de l'APP favorise la dégradation des co-transporteurs. Plusieurs mécanismes sont alors envisageables pour expliquer ce phénomène.

Le premier serait que l'adressage membranaire des KCC2 requière son association avec l'APP. Dans ce contexte, l'augmentation du clivage réduirait le nombre de complexe KCC2/APP. Les KCC2, alors non associés, ne pourraient plus atteindre la membrane et seraient rapidement dégradés. Comme mentionnée précédemment, Gleeson et son équipe ont démontré que la présence d'A β favorisait l'accumulation de l'APP dans l'appareil de Golgi, un site de clivage privilégié, en altérant la fonctions des protéines d'adressage endosomal Alr5b et AP4 (Toh *et al.*, 2017; Tan and Gleeson, 2019). Ces données ont été corroborées par les travaux de notre l'équipe, qui ont mis en évidence une accumulation, de l'APP et son fragment sAPP au niveau du Golgi (Rolland *et al.*, 2020).

Sur la base de ces observations, il est donc envisageable qu'en présence d'A β , l'accumulation de l'APP dans le Golgi augmente son clivage, ce qui contribuerait à la dégradation de KCC2 en réduisant le nombre d'APP disponibles pour une association. Cette hypothèse fait actuellement l'objet d'études, et des expériences préliminaires sont en cours pour quantifier les complexes KCC2/APP et déterminer leur localisation cellulaire.

Dans le cas où l'adressage membranaire des KCC2 n'est pas perturbé, c'est la stabilisation membranaire des co-transporteurs qui pourrait être affecté par le clivage de l'APP. Ce second mécanisme a été proposé par Chen et ses collaborateurs dans une études parue en 2017, révélant que l'interaction entre l'APP et le KCC2 permettrait de limiter la phosphorylation des résidus tyrosine du co-transporteur, empêchant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par la voie lysosomale (Chen *et al.*, 2017). Dans cette même publication, ils ont également souligné l'influence du KCC2 dans la régulation de l'expression de la sous-unité GABA α 1, retrouvée principalement au niveau des récepteurs postsynaptiques.

D'après ces éléments, il serait donc pertinent de définir si des processus comparables sont mis en jeu dans nos modèle expérimentaux. Pour cela, il conviendrait tout d'abord de confirmer l'implication de l'APP dans maintien de

l'expression membranaire des KCC2. Pour cela, nous prévoyons de surexprimer l'APP dans des neurones de souris APP^{KO} afin de quantifier l'expression membranaire et totale des KCC2. Par la suite, une étude réalisée sur des neurones exprimant une forme mutée non phosphorylable des KCC2 pourrait être effectuée afin d'évaluer les conséquences d'une application d'A β sur les courants inhibiteurs. En parallèle, il pourrait être judicieux de comparer le niveau de KCC2 phosphorylés après la perfusion d'oligomères.

Enfin, l'impact de la diminution du KCC2 sur l'expression des sous-unité GABA α 1 a quant à lui été évalué mais aucune modification n'a été mis en évidence à la suite de l'application d'A β o ([Figure Annexe 2](#)). À ce stade, les résultats ne permettent donc pas d'établir un lien entre l'altération de la transmission inhibitrice et une réduction du nombre de récepteurs GABA_A postsynaptiques.

Parallèlement à la réduction de l'expression des KCC2 impliquant le clivage de l'APP, un effet direct de l'A β o sur le co-transporteur ne peut être exclu.

II Conséquence d'un déséquilibre E/I chez les souris APP/PS1-21

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses études ont mis en évidence des modifications de la plasticité synaptique mettant en jeu une altération de l'équilibre E/I (Lei *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2022). Nous avons donc voulu évaluer si la potentialisation du ratio E/I enregistré chez les souris APP/PS1-21 pouvait être à l'origine de changements comparables. La potentialisation de la LTP, observable à la suite de la LTP-TBS mais absente de la LTP-HFS, a révélé une facilitation de la plasticité synaptique qui semblerait être associée à une diminution des apports inhibiteurs. Cette hypothèse a été conforté par l'obtention d'une potentialisation comparable à celle des souris APP/PS1 après le blocage des courants GABAergiques chez les souris WT mais aussi par la perte totale de la potentialisation des courants inhibiteurs évoqués (eIPSCS) chez les animaux transgéniques.

Compte tenu du rôle déterminant des KCC2 dans la régulation de la transmission GABAergique, il est possible que la facilitation observée chez les souris APP/PS1 résulte de la diminution de l'expression du co-transporteur. L'influence du KCC2 sur la régulation de la plasticité à long terme a déjà été mis en évidence par les

travaux de Wang *et al.* (2006). Dans cette étude, il est rapporté que l'induction de la LTP est associée à une augmentation notable des niveaux de KCC2 (Wang, Gong and Xu, 2006). Les données issues de la publication de Chevy, parue en 2015, ont confirmé ces résultats et décrivent notamment l'implication du co-transporteur dans le recrutement des récepteurs AMPA (Chevy *et al.*, 2015).

À l'instar des KCC2, l'APP semble elle aussi impliquée dans les perturbations de la LTP. Ce rôle a été identifié par les travaux de Puzzo *et al.* (2017), montrant que les modifications pathologiques de la LTP induites par l'A β o étaient abolies chez les souris APP^{KO} (Puzzo *et al.*, 2017).

Au vu de ces informations, il serait donc pertinent de compléter notre étude en évaluant la contribution des KCC2 dans les perturbations de la plasticité décrites chez les souris APP/PS1-21 et de définir si l'APP et son clivage sont également mis en jeu.

III Restauration pharmacologique du KCC2

Comme évoqué précédemment, les expériences effectuées sur des tranches d'hippocampe, à la suite de la perfusion exogène d'A β o, ont révélé un déficit des courants inhibiteurs associé à une réduction significative de l'expression du co-transporteur KCC2, élément central dans la régulation de l'activité GABAergique. Au vu de ces résultats, également observables chez les souris APP/PS1-21 âgées d'un mois, nous avons évalué si le renforcement pharmacologique de l'expression des KCC2 pouvait prévenir les perturbations de la neurotransmission inhibitrice et rétablir l'équilibre E/I. Les enregistrements effectués après l'application de CLP257 ou l'injection du CLP290, deux potentialisateurs du KCC2, ont montré que la restauration du niveau des KCC2 était suffisante pour rétablir l'E_{GABA} et ainsi prévenir les modifications de la balance E/I. Ces données sont en accord avec les travaux de Keramidis *et al.* (2023) dans lesquels une restauration des KCC2 membranaires a été observée à la suite d'injection de CLP290 chez des souris 5XFAD alors âgées de six mois (Keramidis *et al.*, 2023). De façon intéressante, cette publication a également montré que la restauration des KCC2 pouvait améliorer les déficits cognitifs et comportementaux décrits chez ces animaux.

Par conséquent, il serait nécessaire d'évaluer si l'administration de CLP290 est suffisante pour empêcher ou ralentir l'apparition des premiers troubles mnésiques dans notre modèle d'études, pour lequel aucun défaut cognitif perceptible n'a été caractérisé avant l'âge de six mois (Paumier *et al.*, 2022).

En plus d'être un composé spécifique qui présente une faible toxicité, un autre avantage du CLP, mis en évidence au cours de nos expériences, a été l'absence d'effet propre. En effet, les données obtenues après injection du CLP290 chez les souris WT n'ont montré aucune différence par rapport aux individus WT injectées avec le véhicule. Des résultats comparables ont également été observés entre les tranches WT traitées avec le CLP257 ou avec le véhicule. Dans l'ensemble, les caractéristiques pharmacologiques du CLP font de cet agent un composé prometteur pour le développement de traitement des maladies neurologiques associées à des modifications de l'activité GABAergique (Dzhala & Staley, 2021 ; Barbour *et al.*, 2021).

IV Les astrocytes, autres acteurs essentiels dans la régulation de la neurotransmission

Afin d'identifier les mécanismes responsables des perturbations précoces de l'équilibre excitation/inhibition (E/I) observées dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer, il est important de prendre en compte le rôle des astrocytes. Traditionnellement considérés comme de simples cellules de soutien, la diversité des processus physiologiques dans lesquels les astrocytes sont impliqués en font des éléments fondamentaux capables d'influencer l'environnement extracellulaire et l'activité des cellules neuronales voisines. Dans la région CA1 de l'hippocampe, l'activité des neurones pyramidaux que nous avons enregistrés, est directement régulée par les interneurons environnants, mais également influencée par les astrocytes. Représentant environ 20 % des cellules du cerveau, les astrocytes interagissent de manière bidirectionnelle avec les neurones, régulant des paramètres essentiels tels que l'homéostasie du glutamate, l'excitabilité neuronale et les processus de plasticité synaptique (Von Bartheld, Bahney and Herculano-Houzel, 2016; Acosta, Anderson and Anderson, 2017).

Lors des phases précoces de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation d'oligomères β -amyloïdes ($A\beta_o$) a été associée à des perturbations de la physiologie astrocytaire, contribuant ainsi au déséquilibre de la balance E/I (Mitroshina, Kalinina and Vedunova, 2023). À ce propos, des travaux menés au sein de l'équipe, par Anthony Bosson, ont révélé qu'une application d' $A\beta_o$ pouvait induire une hyperactivité calcique astrocytaire, qui, en retour, entraînerait une augmentation de l'activité excitatrice spontanée neuronale (Bosson *et al.*, 2017). Par ailleurs, la perturbation de l'homéostasie du glutamate, mettant en jeu le transporteur astrocytaire GLT-1, semblerait jouer un rôle essentiel dans l'excitotoxicité et le déclin cognitif souvent observée chez les patients Alzheimer (Scott *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2019).

Parallèlement à leur rôle dans la modulation du système exciteur, les astrocytes sont également impliqués dans la régulation de la transmission inhibitrice. En plus de contrôler la synthèse et la libération du GABA, l'activation de leurs récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ peut influencer l'activité des interneurons environnants (Matos *et al.*, 2018; Ishibashi, Egawa and Fukuda, 2019). Des perturbations de l'activité inhibitrice, impliquant les astrocytes, ont d'ailleurs été associées à la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Les travaux de Jo *et al.* (2014) ont notamment montré que la libération accrue de GABA astrocytaire, via le canal Best-1 (*Bestrophin channel -1*), serait associée à des altérations de la plasticité synaptique, de l'apprentissage et de la mémoire chez les modèles murins d'Alzheimer. En outre, une augmentation significative du GABA a également été observée dans les astrocytes provenant de cerveaux de patients Alzheimer. (Jo *et al.*, 2014).

Enfin, de façon similaire aux effets rapportés dans les neurones, la présence d' $A\beta_o$ semblerait également augmenter l'expression de l'APP et de la β -sécrétase astrocytaires contribuant de manière significative à la charge amyloïde dans la MA (Heneka *et al.*, 2005; Zhao, 2011). Dans l'ensemble, ces données suggèrent qu'une altération astrocytaire induite par l'accumulation précoce d' $A\beta_o$ pourrait participer aux perturbations de l'équilibre E/I que nous avons observé au cours de notre étude.

Conclusion générale

En conclusion, les travaux menés au cours de ma thèse ont mis en évidence une altération de la balance E/I dans l'hippocampe de souris modèle de la maladie d'Alzheimer âgées d'un mois, induite par l'accumulation précoce des formes oligomérique du peptide A β . Ce déséquilibre résulte notamment d'une réduction de la neurotransmission inhibitrice, liée à une augmentation pathologique du clivage de l'APP et à une diminution conséquente de l'expression des cotransporteurs KCC2.

La perturbation de cet équilibre joue un rôle majeur dans le déclin cognitif caractérisé dans la maladie d'Alzheimer. La compréhension des mécanismes sous-jacents revêt donc une importance capitale pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à prévenir l'apparition de cette pathologie. Dans ce contexte, le co-transporteur KCC2 constitue une cible intéressante puisque l'augmentation pharmacologique de son expression a permis de prévenir l'apparition du déséquilibre E/I caractérisé chez les animaux transgéniques.

Plusieurs questions subsistent néanmoins, notamment concernant l'utilisation du CLP et son action sur les KCC2. S'il a été largement utilisé, le mécanisme par lequel le CLP favorise l'expression des co-transporteurs reste encore incompris.

On peut également s'interroger sur les conséquences de la restauration de l'équilibre E/I. Notre étude a été réalisée chez de jeunes animaux. Les effets à long terme de l'administration du CLP concernant les perturbations de la plasticité synaptique observées à un mois ainsi que leur conséquence sur les déficits cognitifs détectables à six mois n'ont donc pas été évalués. Bien que des résultats favorables aient été observés dans un modèle d'Alzheimer similaire, où une diminution des KCC2 avait également été caractérisée, il est essentiel d'évaluer ces paramètres plus en détail avant d'envisager l'utilisation thérapeutique du CLP.

En somme, parallèlement à l'élaboration de nouveaux outils de diagnostics précoces, ces données offrent des perspectives prometteuses pour le développement de traitements susceptibles de corriger les perturbations de l'équilibre E/I en intervenant avant l'apparition des symptômes cliniques.

Annexes

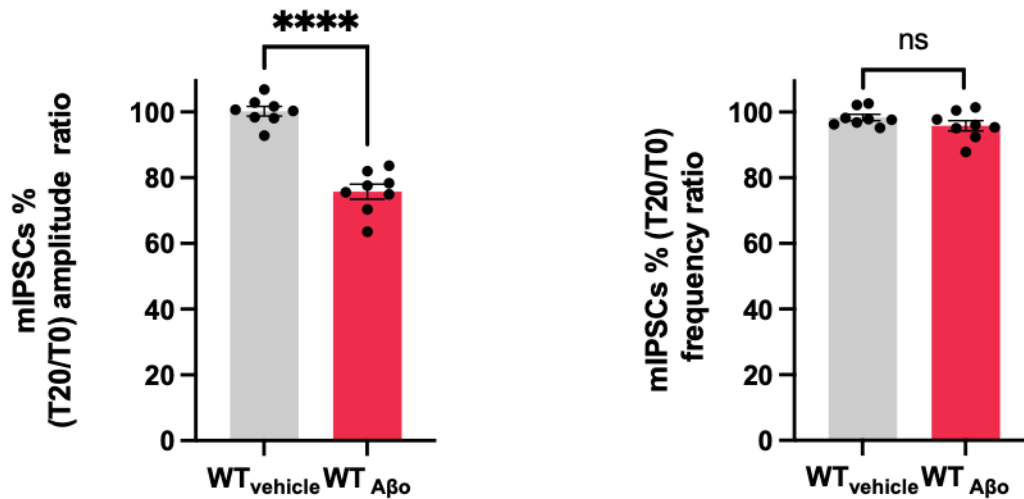


Figure annexe 1 : Les oligomères β -amyloïdes modifient l'amplitude mais pas la fréquence des mIPSCs enregistrés dans les cellules pyramidales de CA1 chez les souris WT.

A et B, Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM de l'amplitude et de la fréquence des sIPSCs enregistrés à T20 dans les neurones CA1 de souris WT traitées ou non avec l'A β 0 et normalisé par la valeur obtenue pendant la ligne de base chez le véhicule (WT_{vehicule}, barres grises ; WT_{Aβ0}, barres rouges ; amplitude ; n=8 ; p= 0.0001 et fréquence ; n=8 ; p= 0.1835). Test t non apparié, ****p < 0 .0001 ; ns : non significatif.

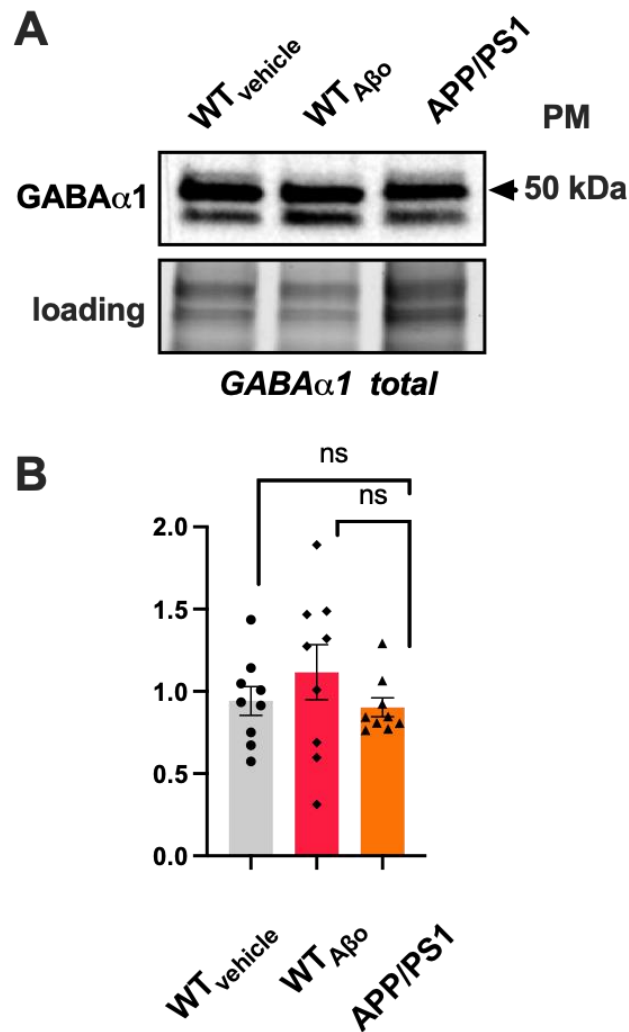


Figure annexe 2 : Les perturbations de la neurotransmission inhibitrice induites par l'A β ne sont pas associées à une diminution de l'expression des récepteurs postsynaptiques GABA_A.

A, Immunoblots représentatifs des extraits hippocampiques de tranches de souris WT incubées avec le véhicule ou l'A β et de tranches de souris APP/PS1-21. B, Quantification par immunoblots des sous-unités α 1 dans les lysats de tranches incubées avec le véhicule ou l'A β et les tranches de souris APP/PS1-21. Le graphique montre la moyenne \pm SEM dans les tranches de souris WT_{véhicule} (niveau relatif de protéines α 1 : 0.94 ± 0.09 chez les WT_{véhicule} ; n=9 souris, barre grise) dans les tranches WT_{A β 0} (niveau relatif de protéines α 1 : 1.12 ± 0.16 pour les WT_{A β 0} ; n=12 souris, barre rouge ; p=0,53 par rapport au WT_{véhicule}) et dans les tranches APP/PS1 (niveau relatif de protéines α 1 : 0.90 ± 0.06 chez les APP/PS1 ; n=9 souris, barre orange ; p=0,97 par rapport au WT_{véhicule}). Test de Kruskal-Wallis et test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples. ns = non significatif.

Références

- A. Armstrong, R. (2019) 'Risk factors for Alzheimer's disease', *Folia Neuropathologica*, 57(2), pp. 87–105. Available at: <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>.
- Abramov, E. *et al.* (2009) 'Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses', *Nature Neuroscience*, 12(12), pp. 1567–1576. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2433>.
- Acosta, C., Anderson, H.D. and Anderson, C.M. (2017) 'Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease', *Journal of Neuroscience Research*, 95(12), pp. 2430–2447. Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.24075>.
- Acs \blacklozenge dy, L. *et al.* (1997) 'Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus', *The Journal of Comparative Neurology*, 378(3), pp. 320–336. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970217\)378:3<320::AID-CNE2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970217)378:3<320::AID-CNE2>3.0.CO;2-5).
- Agez, M. *et al.* (2017) 'Molecular architecture of potassium chloride co-transporter KCC2', *Scientific Reports*, 7(1), p. 16452. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15739-1>.
- Al Awabdh, S. *et al.* (2022) 'Gephyrin Interacts with the K-Cl Cotransporter KCC2 to Regulate Its Surface Expression and Function in Cortical Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 42(2), pp. 166–182. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2926-20.2021>.
- Alakuijala, A., Alakuijala, J. and Pasternack, M. (2006) 'Evidence for a functional role of GABA_c receptors in the rat mature hippocampus', *European Journal of Neuroscience*, 23(2), pp. 514–520. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04572.x>.

- Alford, S. *et al.* (2018) 'Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence', *Obesity Reviews*, 19(2), pp. 269–280. Available at: <https://doi.org/10.1111/obr.12629>.
- Andersen, P., Bland, B.H. and Dudar, J.D. (1973) 'Organization of the hippocampal output', *Experimental Brain Research*, 17(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00235025>.
- Andersen, P., Bliss, T.V.P. and Skrede, K.K. (1971) 'Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways', *Experimental Brain Research*, 13(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00234087>.
- Anderson, C.M. and Swanson, R.A. (2000) 'Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions', *Glia*, 32(1), pp. 1–14. Available at: [https://doi.org/10.1002/1098-1136\(200010\)32:1<1::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1098-1136(200010)32:1<1::AID-GLIA10>3.0.CO;2-W).
- Andreasen, N. and Blennow, K. (2005) 'CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 107(3), pp. 165–173. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2004.10.011>.
- Anwyl, R. (1999) 'Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity'.
- Anwyl, R. (2009) 'Metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation', *Neuropharmacology*, 56(4), pp. 735–740. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.01.002>.
- Asuni, A.A. *et al.* (2007) 'Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements', *The Journal of Neuroscience*, 27(34), pp. 9115–9129. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>.
- Auerbach, A.A. and Bennett, M.V.L. (1969) 'Chemically Mediated Transmission at a Giant Fiber Synapse in the Central Nervous System of a Vertebrate', *The Journal of General Physiology*, 53(2), pp. 183–210. Available at: <https://doi.org/10.1085/jgp.53.2.183>.

- Bachur, R.G., Monuteaux, M.C. and Neuman, M.I. (2015) 'A Comparison of Acute Treatment Regimens for Migraine in the Emergency Department', *Pediatrics*, 135(2), pp. 232–238. Available at: <https://doi.org/10.1542/peds.2014-2432>.
- Baglietto-Vargas, D. *et al.* (2021) 'Generation of a humanized A β expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology', *Nature Communications*, 12(1), p. 2421. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22624-z>.
- Baines, A.J., Lu, H.-C. and Bennett, P.M. (2014) 'The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(2), pp. 605–619. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.030>.
- Bakker, A. *et al.* (2012) 'Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment', *Neuron*, 74(3), pp. 467–474. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.023>.
- Ballard, C. *et al.* (2011) 'Alzheimer's disease', *The Lancet*, 377(9770), pp. 1019–1031. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- Balschun, D. *et al.* (1999) 'A Specific Role for Group I mGluRs in Hippocampal LTP and Hippocampus-Dependent Spatial Learning', *Learning & Memory*, 6(2), pp. 138–152. Available at: <https://doi.org/10.1101/lm.6.2.138>.
- Balusu, S. *et al.* (2023) 'MEG3 activates necroptosis in human neuron xenografts modeling Alzheimer's disease', *Science*, 381(6663), pp. 1176–1182. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.abp9556>.
- Barbour, A.J. *et al.* (2020) 'HIV and opiates dysregulate K⁺- Cl⁻ cotransporter 2 (KCC2) to cause GABAergic dysfunction in primary human neurons and Tat-transgenic mice', *Neurobiology of Disease*, 141, p. 104878. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104878>.

- Barbour, A.J. *et al.* (2021) 'Restoration of KCC2 Membrane Localization in Striatal Dopamine D2 Receptor-Expressing Medium Spiny Neurons Rescues Locomotor Deficits in HIV Tat-Transgenic Mice', *ASN Neuro*, 13, p. 175909142110220. Available at: <https://doi.org/10.1177/17590914211022089>.
- Basu, J. *et al.* (2013) 'A Cortico-Hippocampal Learning Rule Shapes Inhibitory Microcircuit Activity to Enhance Hippocampal Information Flow', *Neuron*, 79(6), pp. 1208–1221. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.001>.
- Bateman, R.J. *et al.* (2012) 'Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease', *New England Journal of Medicine*, 367(9), pp. 795–804. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202753>.
- Beach, R.L., Bathgate, S.L. and Cotman, C.W. (1982) 'Identification of cell types in rat hippocampal slices maintained in organotypic cultures', *Developmental Brain Research*, 3(1), pp. 3–20. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(82\)90071-2](https://doi.org/10.1016/0165-3806(82)90071-2).
- Bear, M.F. and Malenka, R.C. (1994) 'Synaptic plasticity: LTP and LTD', *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3), pp. 389–399. Available at: [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90101-5).
- Bekiari, C. *et al.* (2015) 'Neurogenesis in the septal and temporal part of the adult rat dentate gyrus', *Hippocampus*, 25(4), pp. 511–523. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.22388>.
- Bellenguez, C. *et al.* (2022) 'New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias', *Nature Genetics*, 54(4), pp. 412–436. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.
- Ben-Ari, Y. (2002) 'Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture', *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), pp. 728–739. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn920>.
- Ben-Ari, Y. *et al.* (2012) 'The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders', *The Neuroscientist*, 18(5), pp. 467–486. Available at: <https://doi.org/10.1177/1073858412438697>.

- Ben-Ari, Y. (2014) 'The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey', *Neuroscience*, 279, pp. 187–219. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.001>.
- Benarroch, E.E. (2011) 'NMDA receptors: Recent insights and clinical correlations', *Neurology*, 76(20), pp. 1750–1757. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821b7cc9>.
- Benilova, I., Karran, E. and De Strooper, B. (2012) 'The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes', *Nature Neuroscience*, 15(3), pp. 349–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3028>.
- Bernier, B.E. *et al.* (2017) 'Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction', *The Journal of Neuroscience*, 37(26), pp. 6359–6371. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017>.
- Bittner, T. *et al.* (2012) 'Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss', *Acta Neuropathologica*, 124(6), pp. 797–807. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1047-8>.
- Blaesse, P. *et al.* (2006) 'Oligomerization of KCC2 Correlates with Development of Inhibitory Neurotransmission', *The Journal of Neuroscience*, 26(41), pp. 10407–10419. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-06.2006>.
- Booker, S.A. and Vida, I. (2018) 'Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons', *Cell and Tissue Research*, 373(3), pp. 619–641. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2882-2>.
- Bormann, J. (2000) 'The "ABC" of GABA receptors', *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(1), pp. 16–19. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(99\)01413-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(99)01413-3).
- Bosson, A. *et al.* (2017) 'TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺ hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 53. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0194-8>.

- Bousiges, O. *et al.* (2016) 'Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Biomarkers (Phospho-Tau181, total-Tau, A β 42, and A β 40) in Prodromal Stage of Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies', *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(4), pp. 1069–1083. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-150731>.
- Boutajangout, A. *et al.* (2011) 'Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain', *Journal of Neurochemistry*, 118(4), pp. 658–667. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x>.
- Boyes, R.G. *et al.* (2006) 'Cerebral atrophy measurements using Jacobian integration: Comparison with the boundary shift integral', *NeuroImage*, 32(1), pp. 159–169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.02.052>.
- Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00308809>.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R. and Clark, R.E. (2004) 'Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), pp. 14515–14520. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406344101>.
- Brookhouser, N. *et al.* (2021) 'APOE2 mitigates disease-related phenotypes in an isogenic hiPSC-based model of Alzheimer's disease', *Molecular Psychiatry*, 26(10), pp. 5715–5732. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01076-3>.
- Brun, V.H. *et al.* (2002) 'Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry', *Science*, 296(5576), pp. 2243–2246. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1071089>.
- Buerger, K. *et al.* (2002) 'Differential Diagnosis of Alzheimer Disease With Cerebrospinal Fluid Levels of Tau Protein Phosphorylated at Threonine 231', *Archives of Neurology*, 59(8), p. 1267. Available at: <https://doi.org/10.1001/archneur.59.8.1267>.

- Busche, M.A. *et al.* (2008) 'Clusters of Hyperactive Neurons Near Amyloid Plaques in a Mouse Model of Alzheimer's Disease', *Science*, 321(5896), pp. 1686–1689. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1162844>.
- Busche, M.A. *et al.* (2012) 'Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), pp. 8740–8745. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1206171109>.
- Butt, A. and Verkhratsky, A. (2018) 'Neuroglia: Realising their true potential', *Brain and Neuroscience Advances*, 2, p. 239821281881749. Available at: <https://doi.org/10.1177/2398212818817495>.
- Butterfield, D.A. *et al.* (1997) 'Oxidatively Induced Structural Alteration of Glutamine Synthetase Assessed by Analysis of Spin Label Incorporation Kinetics: Relevance to Alzheimer's Disease', *Journal of Neurochemistry*, 68(6), pp. 2451–2457. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68062451.x>.
- Camporesi, E. *et al.* (2020) 'Fluid Biomarkers for Synaptic Dysfunction and Loss', *Biomarker Insights*, 15, p. 117727192095031. Available at: <https://doi.org/10.1177/1177271920950319>.
- Cardarelli, R.A. *et al.* (2017) 'The small molecule CLP257 does not modify activity of the K⁺–Cl[–] co-transporter KCC2 but does potentiate GABAA receptor activity', *Nature Medicine*, 23(12), pp. 1394–1396. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.4442>.
- Castellano, J.M. *et al.* (2012) 'Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood A β clearance in a mouse model of β -amyloidosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), pp. 15502–15507. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1206446109>.
- Castro, P., Zaman, S. and Holland, A. (2017) 'Alzheimer's disease in people with Down's syndrome: the prospects for and the challenges of developing preventative treatments', *Journal of Neurology*, 264(4), pp. 804–813. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8308-8>.

- Cataldo, J.K., Prochaska, J.J. and Glantz, S.A. (2010) 'Cigarette Smoking is a Risk Factor for Alzheimer's Disease: An Analysis Controlling for Tobacco Industry Affiliation', *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(2), pp. 465–480. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1240>.
- Caughey, G.E. *et al.* (2010) 'Increased risk of hip fracture in the elderly associated with prochlorperazine: is a prescribing cascade contributing?', *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 19(9), pp. 977–982. Available at: <https://doi.org/10.1002/pds.2009>.
- Celone, K.A. *et al.* (2006) 'Alterations in Memory Networks in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: An Independent Component Analysis', *The Journal of Neuroscience*, 26(40), pp. 10222–10231. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2250-06.2006>.
- Chai, X. *et al.* (2011) 'Passive Immunization with Anti-Tau Antibodies in Two Transgenic Models', *Journal of Biological Chemistry*, 286(39), pp. 34457–34467. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229633>.
- Chalifoux, J.R. and Carter, A.G. (2010) 'GABAB Receptors Modulate NMDA Receptor Calcium Signals in Dendritic Spines', *Neuron*, 66(1), pp. 101–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.012>.
- Chalifoux, J.R. and Carter, A.G. (2011) 'GABA_B Receptor Modulation of Voltage-Sensitive Calcium Channels in Spines and Dendrites', *The Journal of Neuroscience*, 31(11), pp. 4221–4232. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4561-10.2011>.
- Chamma, I. *et al.* (2012) 'Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00005>.
- Chamma, I. *et al.* (2013) 'Activity-Dependent Regulation of the K/Cl Transporter KCC2 Membrane Diffusion, Clustering, and Function in Hippocampal Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 33(39), pp. 15488–15503. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5889-12.2013>.

- Chapman, C.A., Perez, Y. and Lacaille, J.-C. (1998) 'Effects of GABAA inhibition on the expression of long-term potentiation in CA1 pyramidal cells are dependent on tetanization parameters', p. 10.
- Chater, T.E. and Goda, Y. (2014) 'The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00401>.
- Chauhan, P. *et al.* (2021) 'The Anatomy of the Hippocampus', in Laboratory of Ischemic and Neurodegenerative Brain Research, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland and P. Ryszard (eds) *Cerebral Ischemia*. Exon Publications, pp. 17–30. Available at: <https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>.
- Chen, C. *et al.* (2022) 'Early impairment of cortical circuit plasticity and connectivity in the 5XFAD Alzheimer's disease mouse model', *Translational Psychiatry*, 12(1), p. 371. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02132-4>.
- Chen, G. *et al.* (2017) 'Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development', *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), pp. 1205–1235. Available at: <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
- Chen, M. *et al.* (2017) 'APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition', *eLife*, 6, p. e20142. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.20142>.
- Cherubini, E., Gaiarsa, J.L. and Ben-Aft, Y. (1991) 'GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life', 14(12).
- Chevy, Q. *et al.* (2015) 'KCC2 Gates Activity-Driven AMPA Receptor Traffic through Cofilin Phosphorylation', *The Journal of Neuroscience*, 35(48), pp. 15772–15786. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1735-15.2015>.
- Chew, T.A. *et al.* (2019) 'Structure and mechanism of the cation–chloride cotransporter NKCC1', *Nature*, 572(7770), pp. 488–492. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1438-2>.

- Chin-Chan, M. *et al.* (2015) 'Mercury Reduces the Enzymatic Activity of Neprilysin in Differentiated SH-SY5Y Cells', *Toxicological Sciences*, 145(1), pp. 128–137. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv037>.
- Choi, D.W. (1992) 'Excitotoxic cell death', *Journal of Neurobiology*, 23(9), pp. 1261–1276. Available at: <https://doi.org/10.1002/neu.480230915>.
- Clements, J.D. *et al.* (1992) 'The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft', *Science, New Series*, 258(5087), pp. 1498–1501.
- Cohen, N.J. and Squire, L.R. (1980) 'Preserved Learning and Retention of Pattern-Analyzing Skill in Amnesia: Dissociation of Knowing How and Knowing That', *Science*, 210(4466), pp. 207–210. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7414331>.
- Coleman, R.E. (2007) 'Positron Emission Tomography Diagnosis of Alzheimer's Disease', *PET Clinics*, 2(1), pp. 25–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2007.09.003>.
- Côme, E. *et al.* (2019) 'Reciprocal Regulation of KCC2 Trafficking and Synaptic Activity', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, p. 48. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00048>.
- Delaney, A.J. and Sah, P. (2001) 'Pathway-Specific Targeting of GABA_A Receptor Subtypes to Somatic and Dendritic Synapses in the Central Amygdala', *Journal of Neurophysiology*, 86(2), pp. 717–723. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.2.717>.
- Delpire, E. *et al.* (2009) 'Small-molecule screen identifies inhibitors of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), pp. 5383–5388. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0812756106>.
- DeTure, M.A. and Dickson, D.W. (2019) 'The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease', *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), p. 32. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>.

- Dickerson, B.C. *et al.* (2005) 'Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD', *Neurology*, 65(3), pp. 404–411. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000171450.97464.49>.
- Dickson, D.W. *et al.* (1992) 'Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans', *Neurobiology of Aging*, 13(1), pp. 179–189. Available at: [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90027-U](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90027-U).
- Dickstein, D.L. *et al.* (2010) 'Role of Vascular Risk Factors and Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease', *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1), pp. 82–102. Available at: <https://doi.org/10.1002/msj.20155>.
- Dolev, I. *et al.* (2013) 'Spike bursts increase amyloid- β 40/42 ratio by inducing a presenilin-1 conformational change', *Nature Neuroscience*, 16(5), pp. 587–595. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3376>.
- Doshina, A. *et al.* (2017) 'Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission', *Scientific Reports*, 7(1), p. 370. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00325-2>.
- Doyon, N. *et al.* (2016) 'Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition', *Neuron*, 89(6), pp. 1157–1172. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.030>.
- Drago, V. *et al.* (2011) 'Disease Tracking Markers for Alzheimer's Disease at the Prodromal (MCI) Stage', *Journal of Alzheimer's Disease*. Edited by J.W. Ashford *et al.*, 26(s3), pp. 159–199. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-0043>.
- Dubois, C.J. *et al.* (2018) 'Role of the K⁺-Cl⁻ Cotransporter KCC2a Isoform in Mammalian Respiration at Birth', *eneuro*, 5(5), p. ENEURO.0264-18.2018. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0264-18.2018>.
- Dzhala, V.I. and Staley, K.J. (2021) 'KCC2 Chloride Transport Contributes to the Termination of Ictal Epileptiform Activity', *eneuro*, 8(2), p. ENEURO.0208-20.2020. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0208-20.2020>.

- Eichenbaum, H., Otto, T. and Cohen, N.J. (1992) 'The hippocampus—what does it do?', *Behavioral and Neural Biology*, 57(1), pp. 2–36. Available at: [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90724-I](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90724-I).
- Ergorul, C. and Eichenbaum, H. (2004) 'The Hippocampus and Memory for “What,” “Where,” and “When”', *Learning & Memory*, 11(4), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.1101/lm.73304>.
- Ettcheto, M. *et al.* (2020) 'Benzodiazepines and Related Drugs as a Risk Factor in Alzheimer's Disease Dementia', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, p. 344. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00344>.
- Fahrenholz, F. (2007) 'Alpha-Secretase As a Therapeutic Target', *Current Alzheimer Research*, 4(4), pp. 412–417. Available at: <https://doi.org/10.2174/156720507781788837>.
- Farrer, L.A. (1997) 'Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis', *JAMA*, 278(16), p. 1349. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550160069041>.
- Fiumelli, H. *et al.* (2013) 'An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spineogenesis In Vivo', *Cerebral Cortex*, 23(2), pp. 378–388. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs027>.
- Fiumelli, H., Cancedda, L. and Poo, M. (2005) 'Modulation of GABAergic Transmission by Activity via Postsynaptic Ca²⁺-Dependent Regulation of KCC2 Function', *Neuron*, 48(5), pp. 773–786. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.025>.
- Fiumelli, H. and Woodin, M.A. (2007) 'Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development', *Current Opinion in Neurobiology*, 17(1), pp. 81–86. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.01.002>.
- Flores-Cordero, J.A. *et al.* (2022) 'Obesity as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: The Role of Leptin', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), p. 5202. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23095202>.

- Friedel, P. *et al.* (2017) 'A Novel View on the Role of Intracellular Tails in Surface Delivery of the Potassium-Chloride Cotransporter KCC2', *eneuro*, 4(4), p. ENEURO.0055-17.2017. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0055-17.2017>.
- Gagnon, M. *et al.* (2013) 'Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1524–1528. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3356>.
- Gatz, M. *et al.* (2006) 'Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease', *Archives of General Psychiatry*, 63(2), p. 168. Available at: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>.
- Gengler, S., Hamilton, A. and Hölscher, C. (2010) 'Synaptic Plasticity in the Hippocampus of a APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Is Impaired in Old but Not Young Mice', *PLoS ONE*. Edited by S. Gaetani, 5(3), p. e9764. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009764>.
- Gielen, M. (2010) 'Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate: Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice', *médecine/sciences*, 26(1), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/201026165>.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P. and Lee, I. (2001) 'Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1', *Hippocampus*, 11(6), pp. 626–636. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.1077>.
- Giuffrida, M.L. *et al.* (2009) 'β-Amyloid Monomers Are Neuroprotective', *The Journal of Neuroscience*, 29(34), pp. 10582–10587. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009>.
- Goate, A. (2006) 'Segregation of a missense mutation in the amyloid β-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(s3), pp. 341–347. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9S338>.

- González, A. *et al.* (2022) 'Glucose metabolism and AD: evidence for a potential diabetes type 3', *Alzheimer's Research & Therapy*, 14(1), p. 56. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13195-022-00996-8>.
- Graves, A.B. *et al.* (1991) 'Alcohol and Tobacco Consumption as Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Collaborative Re-Analysis of Case-Control Studies', *International Journal of Epidemiology*, 20(Supplement 2), pp. S48–S57. Available at: https://doi.org/10.1093/ije/20.Supplement_2.S48.
- Gravina, S.A. *et al.* (1995) 'Amyloid β Protein ($A\beta$) in Alzheimer's Disease Brain', *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7013–7016. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7013>.
- Gulisano, W. *et al.* (2019) 'Neuromodulatory Action of Picomolar Extracellular $A\beta$ 42 Oligomers on Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Synaptic Function and Memory', *The Journal of Neuroscience*, 39(30), pp. 5986–6000. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0163-19.2019>.
- Gulyás, A.I. *et al.* (2001) 'The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus', *European Journal of Neuroscience*, 13(12), pp. 2205–2217. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01600.x>.
- Guntupalli, S., Widagdo, J. and Anggono, V. (2016) 'Amyloid- β -Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking', *Neural Plasticity*, 2016, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/3204519>.
- Guo, Z. *et al.* (2001) 'Apolipoprotein E Genotypes and the Incidence of Alzheimer's Disease among Persons Aged 75 Years and Older: Variation by Use of Antihypertensive Medication?', *American Journal of Epidemiology*, 153(3), pp. 225–231. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/153.3.225>.
- Hall, A.M. and Roberson, E.D. (2012) 'Mouse models of Alzheimer's disease', *Brain Research Bulletin*, 88(1), pp. 3–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.11.017>.

- Hamid, R. *et al.* (2007) 'Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content', *Journal of Neurochemistry*, 102(4), pp. 1264–1275. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04627.x>.
- Hartl, D. *et al.* (2013) 'Soluble Alpha-APP (sAPP α) Regulates CDK5 Expression and Activity in Neurons', *PLoS ONE*. Edited by D. Kretschmar, 8(6), p. e65920. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065920>.
- Hartley, D. *et al.* (2015) 'Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals', *Alzheimer's & Dementia*, 11(6), pp. 700–709. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.007>.
- Hartley, D.M. *et al.* (1999) 'Protofibrillar Intermediates of Amyloid β -Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 19(20), pp. 8876–8884. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-08876.1999>.
- Hashimoto, T. *et al.* (2012) 'Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid β Peptide', *The Journal of Neuroscience*, 32(43), pp. 15181–15192. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012>.
- Hector, A. and Brouillette, J. (2021) 'Hyperactivity Induced by Soluble Amyloid- β Oligomers in the Early Stages of Alzheimer's Disease', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, p. 600084. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.600084>.
- Hefendehl, J.K. *et al.* (2016) 'Mapping synaptic glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding A β plaques by iGluSnFR two-photon imaging', *Nature Communications*, 7(1), p. 13441. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms13441>.
- Hemonnot-Girard, A.-L. *et al.* (2021) 'De nouvelles techniques pour dévoiler le rôle des cellules gliales du cerveau', *médecine/sciences*, 37(1), pp. 59–67. Available at: <https://doi.org/10.1051/medsci/2020253>.

- Hempel, C. *et al.* (2013) 'The phenothiazine-class antipsychotic drugs prochlorperazine and trifluoperazine are potent allosteric modulators of the human P2X7 receptor', *Neuropharmacology*, 75, pp. 365–379. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.027>.
- Heneka, M.T. *et al.* (2005) 'Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice', *Journal of Neuroinflammation*, 2(1), p. 22. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-22>.
- Herguedas, B. *et al.* (2016) 'Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors', *Science*, 352(6285), p. aad3873. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aad3873>.
- Heubl, M. *et al.* (2017) 'GABAA receptor dependent synaptic inhibition rapidly tunes KCC2 activity via the Cl⁻-sensitive WNK1 kinase', *Nature Communications*, 8(1), p. 1776. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01749-0>.
- Hommet, C. *et al.* (2016) 'Symptomatic treatments in Alzheimer's disease in 2016: a study from Memory centers in France', *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillessement*, 14(3), pp. 274–286. Available at: <https://doi.org/10.1684/pnv.2016.0629>.
- Howard, R. *et al.* (2015) 'Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses', *The Lancet Neurology*, 14(12), pp. 1171–1181. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00258-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00258-6).
- Huang, Y. and Mahley, R.W. (2014) 'Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases', *Neurobiology of Disease*, 72, pp. 3–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.025>.
- Hunsaker, M.R., Rosenberg, J.S. and Kesner, R.P. (2008) 'The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty', *Hippocampus*, 18(10), pp. 1064–1073. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.20464>.

- Hur, J.-Y. (2022) 'γ-Secretase in Alzheimer's disease', *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), pp. 433–446. Available at: <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00754-8>.
- Ingelsson, M. *et al.* (2004) 'Early Aβ accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain', *Neurology*, 62(6), pp. 925–931. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000115115.98960.37>.
- Ishibashi, M., Egawa, K. and Fukuda, A. (2019) 'Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), p. 2964. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20122964>.
- Ivakine, E.A. *et al.* (2013) 'Neto2 is a KCC2 interacting protein required for neuronal Cl⁻ regulation in hippocampal neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), pp. 3561–3566. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1212907110>.
- Iwatsubo, T. *et al.* (1995) 'Amyloid β protein (Aβ) deposition: Aβ42(43) precedes Aβ40 in down Syndrome', *Annals of Neurology*, 37(3), pp. 294–299. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.410370305>.
- Jayaraj, R.L., Azimullah, S. and Beiram, R. (2020) 'Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease in the Middle East and its shared pathological mediators', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), pp. 736–750. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.028>.
- Jeun, S.H. *et al.* (2009) 'Electrophysiological Characterization of AMPA and NMDA Receptors in Rat Dorsal Striatum', *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 13(3), p. 209. Available at: <https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.3.209>.
- Jo, S. *et al.* (2014) 'GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease', *Nature Medicine*, 20(8), pp. 886–896. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3639>.

- Jonsson, T. *et al.* (2012) 'A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline', *Nature*, 488(7409), pp. 96–99. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature11283>.
- Jouanne, M., Rault, S. and Voisin-Chiret, A.-S. (2017) 'Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, pp. 153–167. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>.
- Jourdain, P. *et al.* (2011) 'Determination of Transmembrane Water Fluxes in Neurons Elicited by Glutamate Ionotropic Receptors and by the Cotransporters KCC2 and NKCC1: A Digital Holographic Microscopy Study', *The Journal of Neuroscience*, 31(33), pp. 11846–11854. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0286-11.2011>.
- Jovanovic, J.N. *et al.* (2004) 'Brain-Derived Neurotrophic Factor Modulates Fast Synaptic Inhibition by Regulating GABA_A Receptor Phosphorylation, Activity, and Cell-Surface Stability', *The Journal of Neuroscience*, 24(2), pp. 522–530. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3606-03.2004>.
- Kahle, K.T. *et al.* (2013) 'Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K–Cl cotransporter KCC2', *Trends in Neurosciences*, 36(12), pp. 726–737. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.08.006>.
- Kaila, K. *et al.* (2014) 'Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), pp. 637–654. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn3819>.
- Kamenetz, F. *et al.* (2003) 'APP Processing and Synaptic Function', *Neuron*, 37(6), pp. 925–937. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00124-7).
- Kanaka, C. *et al.* (2001) 'The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system', *Neuroscience*, 104(4), pp. 933–946. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00149-X).

- Karadsheh, M.F. and Delpire, E. (2001) 'Neuronal Restrictive Silencing Element Is Found in the KCC2 Gene: Molecular Basis for KCC2-Specific Expression in Neurons', *Journal of Neurophysiology*, 85(2), pp. 995–997. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.995>.
- Kehoe, E.G. *et al.* (2014) 'Advances in MRI Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease', *Biomarkers in Medicine*, 8(9), pp. 1151–1169. Available at: <https://doi.org/10.2217/bmm.14.42>.
- Kelley, N.E. and Tepper, D.E. (2012) 'Rescue Therapy for Acute Migraine, Part 2: Neuroleptics, Antihistamines, and Others', *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 52(2), pp. 292–306. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2011.02070.x>.
- Keramidis, I. *et al.* (2023) 'Restoring neuronal chloride extrusion reverses cognitive decline linked to Alzheimer's disease mutations', *Brain*, 146(12), pp. 4903–4915. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awad250>.
- Kervern, M. *et al.* (2012) 'Selective Impairment of Some Forms of Synaptic Plasticity by Oligomeric Amyloid- β Peptide in the Mouse Hippocampus: Implication of Extrasynaptic NMDA Receptors', *Journal of Alzheimer's Disease*, 32(1), pp. 183–196. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120394>.
- Kimberly, W.T. and Wolfe, M.S. (2003) 'Identity and function of γ -secretase', *Journal of Neuroscience Research*, 74(3), pp. 353–360. Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.10736>.
- Klausberger, T. and Somogyi, P. (2008) 'Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations', *Science*, 321(5885), pp. 53–57. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1149381>.
- Kleppe, I.C. and Robinson, H.P.C. (1999) 'Determining the Activation Time Course of Synaptic AMPA Receptors from Openings of Colocalized NMDA Receptors', *Biophysical Journal*, 77(3), pp. 1418–1427. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76990-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76990-0).

- Knierim, J.J. (2015) 'The hippocampus', *Current Biology*, 25(23), pp. R1116–R1121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>.
- Kobayashi, E. *et al.* (2018) 'Activated forms of astrocytes with higher GLT-1 expression are associated with cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in human brain', *Scientific Reports*, 8(1), p. 1712. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19442-7>.
- Koch, P. *et al.* (2012) 'Presenilin-1 L166P Mutant Human Pluripotent Stem Cell–Derived Neurons Exhibit Partial Loss of γ -Secretase Activity in Endogenous Amyloid- β Generation', *The American Journal of Pathology*, 180(6), pp. 2404–2416. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.012>.
- Kontsekova, E. *et al.* (2014) 'First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model', *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), p. 44. Available at: <https://doi.org/10.1186/alzrt278>.
- Kosaka, T., Wu, J.-Y. and Benoit, R. (1988) 'GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus', *Experimental Brain Research*, 71(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00247498>.
- Kvartsberg, H. *et al.* (2015) 'Cerebrospinal fluid levels of the synaptic protein neurogranin correlates with cognitive decline in prodromal Alzheimer's disease', *Alzheimer's & Dementia*, 11(10), pp. 1180–1190. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.009>.
- LaFerla, F.M., Green, K.N. and Oddo, S. (2007) 'Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), pp. 499–509. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2168>.
- Lauf, P.K. and Theg, B.E. (1980) 'A CHLORIDE DEPENDENT K⁺ FLUX INDUCED BY N-ETHYLMALIMIDE IN GENETICALLY LOW K_i SHEEP AND GOAT ERYTHROCYTES', 92(4).

- Le, Y. *et al.* (2001) 'Amyloid β_{42} Activates a G-Protein-Coupled Chemoattractant Receptor, FPR-Like-1', *The Journal of Neuroscience*, 21(2), pp. RC123–RC123. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-02-j0003.2001>.
- Lebovitz, H.E. and Banerji, M.A. (2004) 'Treatment of insulin resistance in diabetes mellitus', *European Journal of Pharmacology*, 490(1–3), pp. 135–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.051>.
- Lee, H.H.C. *et al.* (2007) 'Direct Protein Kinase C-dependent Phosphorylation Regulates the Cell Surface Stability and Activity of the Potassium Chloride Cotransporter KCC2', *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), pp. 29777–29784. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705053200>.
- Lee, H.H.C., Jurd, R. and Moss, S.J. (2010) 'Tyrosine phosphorylation regulates the membrane trafficking of the potassium chloride co-transporter KCC2', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(2), pp. 173–179. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.06.008>.
- Lee, H.N., Jeong, M.S. and Jang, S.B. (2021) 'Molecular Characteristics of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Effects in Cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4999. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22094999>.
- Lei, M. *et al.* (2016) 'Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance', *Neurobiology of Disease*, 85, pp. 111–121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.019>.
- Leng, F. and Edison, P. (2021) 'Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?', *Nature Reviews Neurology*, 17(3), pp. 157–172. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>.
- Lévi, S. *et al.* (2004) 'Gephyrin Is Critical for Glycine Receptor Clustering But Not for the Formation of Functional GABAergic Synapses in Hippocampal Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 24(1), pp. 207–217. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1661-03.2004>.

- Li, H. *et al.* (2007) 'KCC2 Interacts with the Dendritic Cytoskeleton to Promote Spine Development', *Neuron*, 56(6), pp. 1019–1033. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.039>.
- Li, Y. *et al.* (2021) 'Reversible GABAergic dysfunction involved in hippocampal hyperactivity predicts early-stage Alzheimer disease in a mouse model', *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), p. 114. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00859-8>.
- Liabeuf, S. *et al.* (2017) 'Prochlorperazine Increases KCC2 Function and Reduces Spasticity after Spinal Cord Injury', *Journal of Neurotrauma*, 34(24), pp. 3397–3406. Available at: <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5152>.
- Lichtenthaler, S.F. (2011) 'Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential: Alpha-secretase in Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 116(1), pp. 10–21. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07081.x>.
- Lindley, C. *et al.* (2005) 'Prevention of Delayed Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting After Moderately High to Highly Emetogenic Chemotherapy: Comparison of Ondansetron, Prochlorperazine, and Dexamethasone', *American Journal of Clinical Oncology*, 28(3), pp. 270–276. Available at: <https://doi.org/10.1097/01.coc.0000145983.35929.2a>.
- López, O.L. and DeKosky, S.T. (2008) 'Clinical symptoms in Alzheimer's disease', in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 207–216. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)01219-5](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)01219-5).
- López-Sanz, D. *et al.* (2017) 'Functional Connectivity Disruption in Subjective Cognitive Decline and Mild Cognitive Impairment: A Common Pattern of Alterations', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, p. 109. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00109>.
- Lorén, I. *et al.* (1979) 'Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain', *Neuroscience*, 4(12), pp. 1953–1976. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90068-X).

- Lorente de Nó *et al.* (1933) 'Studies on the structure of the cerebral cortex. I. Area entorhinalis.', in *Lorente de Nó. (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. I. Area entorhinalis. J. Psychol. Neurol. 45, 381–438.* 45th edn. . Neuro, pp. 381-438.
- Lucas, D.R. and Newhouse, J.P. (1957) 'The Toxic Effect of Sodium L-Glutamate on the Inner Layers of the Retina', *Archives of Ophthalmology*, 58(2), pp. 193–201. Available at: <https://doi.org/10.1001/archopht.1957.00940010205006>.
- Luchetti, S., Huitinga, I. and Swaab, D.F. (2011) 'Neurosteroid and GABA-A receptor alterations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis', *Neuroscience*, 191, pp. 6–21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.04.010>.
- Lukasiewicz, P.D. *et al.* (2004) 'GABAC receptor-mediated inhibition in the retina', *Vision Research*, 44(28), pp. 3289–3296. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.visres.2004.07.023>.
- Ma, J.-J. *et al.* (2021) 'BDNF modulated KCC2 ubiquitylation in spinal cord dorsal horn of mice', *European Journal of Pharmacology*, 906, p. 174205. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174205>.
- Macia, E. *et al.* (2006) 'Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin', *Developmental Cell*, 10(6), pp. 839–850. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>.
- Mahadevan, V. *et al.* (2017) 'Native KCC2 interactome reveals PACSIN1 as a critical regulator of synaptic inhibition', *eLife*, 6, p. e28270. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.28270>.
- Mahmoud, S. *et al.* (2019) 'Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release', *Cells*, 8(2), p. 184. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8020184>.
- Malenka, R.C. (1994) 'Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD', *Cell*, 78(4), pp. 535–538. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90517-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90517-7).

- Markkanen, M. *et al.* (2014) 'Distribution of neuronal KCC2a and KCC2b isoforms in mouse CNS: Differential Localization of Kcc2 isoforms', *Journal of Comparative Neurology*, 522(8), pp. 1897–1914. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.23510>.
- Martínez, G. *et al.* (2017) '18F PET with florbetapir for the early diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI)', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Edited by Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group, 2017(11). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012216.pub2>.
- Masliah, E. *et al.* (1996) 'Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Annals of Neurology*, 40(5), pp. 759–766. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.410400512>.
- Matos, M. *et al.* (2018) 'Astrocytes detect and upregulate transmission at inhibitory synapses of somatostatin interneurons onto pyramidal cells', *Nature Communications*, 9(1), p. 4254. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06731-y>.
- Mattson, M.P. (2017) 'Excitotoxicity', in A. Schapira *et al.* (eds) *Neurodegeneration*. 1st edn. Wiley, pp. 37–45. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781118661895.ch4>.
- Megías, M. *et al.* (2001) 'Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells', *Neuroscience*, 102(3), pp. 527–540. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00496-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00496-6).
- Misgeld, U., Bijak, M. and Jarolimek, W. (1995) 'A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system', *Progress in Neurobiology*, 46(4), pp. 423–462. Available at: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00012-K](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00012-K).
- Mitroshina, E., Kalinina, E. and Vedunova, M. (2023) 'Optogenetics in Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytes', *Antioxidants*, 12(10), p. 1856. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox12101856>.

- Mockett, B.G. *et al.* (2017) 'Therapeutic Potential of Secreted Amyloid Precursor Protein APPs α ', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00030>.
- Moore, Y.E. *et al.* (2018) 'Potentiating KCC2 activity is sufficient to limit the onset and severity of seizures', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(40), pp. 10166–10171. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1810134115>.
- Moreno-Jiménez, E.P. *et al.* (2021) 'Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans', *The Journal of Neuroscience*, 41(12), pp. 2541–2553. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020>.
- Mueller, S.G. *et al.* (2010) 'Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Human Brain Mapping*, 31(9), pp. 1339–1347. Available at: <https://doi.org/10.1002/hbm.20934>.
- Müller, U.C., Deller, T. and Korte, M. (2017) 'Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family', *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), pp. 281–298. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.
- Naber, P.A., Lopes Da Silva, F.H. and Witter, M.P. (2001) 'Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum', *Hippocampus*, 11(2), pp. 99–104. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.1028>.
- Nakanishi, S. (1994) 'Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission, modulation, and plasticity', *Neuron*, 13(5), pp. 1031–1037. Available at: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90043-4).
- Namba, Y. *et al.* (1991) 'Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease', *Brain Research*, 541(1), pp. 163–166. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91092-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91092-F).
- Nishikawa, M., Hirouchi, M. and Kuriyama, K. (1997) 'FUNCTIONAL COUPLING OF Gi SUBTYPE WITH GABAB RECEPTOR/ADENYLYL CYCLASE SYSTEM: ANALYSIS USING A RECONSTITUTED SYSTEM WITH PURIFIED GTP-

- BINDING PROTEIN FROM BOVINE CEREBRAL CORTEX', *Neurochemistry International*, 31(1), pp. 21–25. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(96\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(96)00138-6).
- Nitsch, R., Soriano, E. and Frotscher, M. (1990) 'The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus', *Anatomy and Embryology*, 181(5), pp. 413–425. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02433788>.
- Nunan, J. and Small, D.H. (2000) 'Regulation of APP cleavage by K-, L- and Q-secretases', *FEBS Letters* [Preprint].
- O'Brien, R.J. and Wong, P.C. (2011) 'Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease', *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), pp. 185–204. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>.
- O'Keefe, J. and Dostrovsky, J. (1971) 'The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat', *Brain Research*, 34(1), pp. 171–175. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1).
- O'Keefe, J.M., Nadel, L. and O'Keefe, J. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.
- Olney, J.W. (1969) 'GLUTAMATE—INDUCED RETINAL DEGENERATION IN NEONATAL MICE. ELECTRON MICROSCOPY OF THE ACUTELY EVOLVING LESION':, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 28(3), pp. 455–474. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005072-196907000-00007>.
- Olsen, J.C., Keng, J.A. and Clark, J.A. (2000) 'Frequency of adverse reactions to prochlorperazine in the ED', *The American Journal of Emergency Medicine*, 18(5), pp. 609–611. Available at: <https://doi.org/10.1053/ajem.2000.9283>.
- Olsen, R.W. and Sieghart, W. (2009) 'GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology', *Neuropharmacology*, 56(1), pp. 141–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.045>.
- Onyango, I.G. *et al.* (2021) 'Neuroinflammation in Alzheimer's Disease', *Biomedicines*, 9(5), p. 524. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050524>.

- Palay, S.L. and Palade, G.E. (1955) 'THE FINE STRUCTURE OF NEURONS', *The Journal of Cell Biology*, 1(1), pp. 69–88. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.1.1.69>.
- Palop, J.J. *et al.* (2007) 'Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease', *Neuron*, 55(5), pp. 697–711. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.025>.
- Palop, J.J. (2009) 'Epilepsy and Cognitive Impairments in Alzheimer Disease', *Archives of Neurology*, 66(4), p. 435. Available at: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.15>.
- Palop, J.J. and Mucke, L. (2016) 'Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease', *Nature Reviews Neuroscience*, 17(12), pp. 777–792. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.141>.
- Pardossi-Piquard, R. and Checler, F. (2012) 'The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD', *Journal of Neurochemistry*, 120(s1), pp. 109–124. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x>.
- Parmeggiani, P.L., Azzaroni, A. and Lenzi, P. (1971) 'On the functional significance of the circuit of papez', *Brain Research*, 30(2), pp. 357–374. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90086-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90086-2).
- Paumier, A. *et al.* (2022) 'Astrocyte–neuron interplay is critical for Alzheimer's disease pathogenesis and is rescued by TRPA1 channel blockade', *Brain*, 145(1), pp. 388–405. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awab281>.
- Payne, J.A., Stevenson, T.J. and Donaldson, L.F. (1996) 'Molecular Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain', *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), pp. 16245–16252. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16245>.
- Pelkey, K.A. *et al.* (2017) 'Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons', *Physiological Reviews*, 97(4), pp. 1619–1747. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>.

- Pellegrino, C. *et al.* (2011) 'Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival', *The Journal of Physiology*, 589(10), pp. 2475–2496. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203703>.
- Pereda, A.E. (2014) 'Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses', *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), pp. 250–263. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn3708>.
- Petrache, A.L. *et al.* (2020) 'Selective Modulation of $\alpha 5$ GABAA Receptors Exacerbates Aberrant Inhibition at Key Hippocampal Neuronal Circuits in APP Mouse Model of Alzheimer's Disease', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, p. 568194. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.568194>.
- Piazza-Gardner, A.K., Gaffud, T.J.B. and Barry, A.E. (2013) 'The impact of alcohol on Alzheimer's disease: A systematic review', *Aging & Mental Health*, 17(2), pp. 133–146. Available at: <https://doi.org/10.1080/13607863.2012.742488>.
- Porrero, C. *et al.* (2010) 'Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice', *Brain Research*, 1345, pp. 59–72. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.061>.
- Pressey, J.C. *et al.* (2017) 'A kainate receptor subunit promotes the recycling of the neuron-specific K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 in hippocampal neurons', *Journal of Biological Chemistry*, 292(15), pp. 6190–6201. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767236>.
- Proft, J. and Weiss, N. (2012) 'A protective mutation against Alzheimer disease?', *Communicative & Integrative Biology*, 5(4), pp. 301–303. Available at: <https://doi.org/10.4161/cib.21799>.
- Puskarjov, M. *et al.* (2012) 'Activity-Dependent Cleavage of the K-Cl Cotransporter KCC2 Mediated by Calcium-Activated Protease Calpain', *The Journal of Neuroscience*, 32(33), pp. 11356–11364. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6265-11.2012>.

- Puzzo, D. *et al.* (2008) 'Picomolar Amyloid- β Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus', *The Journal of Neuroscience*, 28(53), pp. 14537–14545. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>.
- Puzzo, D. *et al.* (2017) 'LTP and memory impairment caused by extracellular A β and Tau oligomers is APP-dependent', *eLife*, 6, p. e26991. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.26991>.
- Puzzo, D., Privitera, L. and Palmeri, A. (2012) 'Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory', *Neurobiology of Aging*, 33(7), p. 1484.e15-1484.e24. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.020>.
- Quiroz, Y.T. *et al.* (2010) 'Hippocampal hyperactivation in presymptomatic familial Alzheimer's disease', *Annals of Neurology*, 68(6), pp. 865–875. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.22105>.
- Radde, R. *et al.* (2006) 'A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology', *EMBO reports*, 7(9), pp. 940–946. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>.
- Radulovic, T. *et al.* (2023) 'Serine 937 phosphorylation enhances KCC2 activity and strengthens synaptic inhibition', *Scientific Reports*, 13(1), p. 21660. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48884-x>.
- Reddy, D.S. (2018) 'GABA-A Receptors Mediate Tonic Inhibition and Neurosteroid Sensitivity in the Brain', in *Vitamins and Hormones*. Elsevier, pp. 177–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.12.001>.
- Reiss, A.B. *et al.* (2018) 'Amyloid toxicity in Alzheimer's disease', *Reviews in the Neurosciences*, 29(6), pp. 613–627. Available at: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>.
- Rentsch, P. *et al.* (2024) 'Toward the development of a sporadic model of Alzheimer's disease: comparing pathologies between humanized APP and the familial J20 mouse models', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 16, p. 1421900. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2024.1421900>.

- Rice, H.C. *et al.* (2019) 'Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA_B R1a ligand to modulate synaptic transmission', *Science*, 363(6423), p. eaao4827. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aao4827>.
- Rissman, R.A., De Blas, A.L. and Armstrong, D.M. (2007) 'GABA_A receptors in aging and Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 103(4), pp. 1285–1292. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04832.x>.
- Rivera, C. *et al.* (1999) 'The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation', 397, p. 5.
- Rivera, C. *et al.* (2004) 'Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2', *The Journal of Neuroscience*, 24(19), pp. 4683–4691. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5265-03.2004>.
- Rolland, M. *et al.* (2020) 'Effect of A β Oligomers on Neuronal APP Triggers a Vicious Cycle Leading to the Propagation of Synaptic Plasticity Alterations to Healthy Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 40(27), pp. 5161–5176. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2501-19.2020>.
- Rolls, E.T. (2015) 'Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system', *Cortex*, 62, pp. 119–157. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2013.12.005>.
- Rönicke, R. *et al.* (2011) 'Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors', *Neurobiology of Aging*, 32(12), pp. 2219–2228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.011>.
- Rosenmann, H. (2012) 'CSF Biomarkers for Amyloid and Tau Pathology in Alzheimer's Disease', *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9665-5>.
- Roussa, E. *et al.* (2016) 'The membrane trafficking and functionality of the K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2 is regulated by TGF- β 2', *Journal of Cell Science*, 129(18), pp. 3485–3498. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.189860>.

- Ruiz, A. *et al.* (2005) 'Distinct Subunits in Heteromeric Kainate Receptors Mediate Ionotropic and Metabotropic Function at Hippocampal Mossy Fiber Synapses', *The Journal of Neuroscience*, 25(50), pp. 11710–11718. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4041-05.2005>.
- Rupp, N.J. *et al.* (2011) 'Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPPS1 transgenic mice', *Neurobiology of Aging*, 32(12), p. 2324.e1-2324.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.014>.
- Russell, C.L. *et al.* (2012) 'Amyloid- β Acts as a Regulator of Neurotransmitter Release Disrupting the Interaction between Synaptophysin and VAMP2', *PLoS ONE*. Edited by S.T. Ferreira, 7(8), p. e43201. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043201>.
- Sakmann, B. and Neher, E. (1984) 'Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes'.
- Sanchez, P.E. *et al.* (2012) 'Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1121081109>.
- Santos-Lozano, A. *et al.* (2016) 'Physical Activity and Alzheimer Disease: A Protective Association', *Mayo Clinic Proceedings*, 91(8), pp. 999–1020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.04.024>.
- Sattler, C. *et al.* (2012) 'Cognitive activity, education and socioeconomic status as preventive factors for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Psychiatry Research*, 196(1), pp. 90–95. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.11.012>.
- Schallier, A. *et al.* (2011) 'Region- and Age-Specific Changes in Glutamate Transport in the APP23 Mouse Model for Alzheimer's Disease'.

- Scheff, S.W. *et al.* (2006) 'Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment', *Neurobiology of Aging*, 27(10), pp. 1372–1384. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012>.
- Scheff, S.W. *et al.* (2007) 'Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment', *Neurology*, 68(18), pp. 1501–1508. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>.
- Schmid, L.C. *et al.* (2016) 'Dysfunction of Somatostatin-Positive Interneurons Associated with Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model', *Neuron*, 92(1), pp. 114–125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.034>.
- Scott, H.A. *et al.* (2011) 'Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease', *Neurobiology of Aging*, 32(3), p. 553.e1-553.e11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.008>.
- Scoville, W.B. and Milner, B. (no date) 'LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS'.
- Sedmak, G. *et al.* (2016) 'Developmental Expression Patterns of KCC2 and Functionally Associated Molecules in the Human Brain', *Cerebral Cortex*, 26(12), pp. 4574–4589. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv218>.
- Sepulveda-Falla, D., Glatzel, M. and Lopera, F. (2012) 'Phenotypic Profile of Early-Onset Familial Alzheimer's Disease Caused by Presenilin-1 E280A Mutation', *Journal of Alzheimer's Disease*, 32(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120907>.
- Serneels, L. *et al.* (2009) 'γ-Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease', *Science*, 324(5927), pp. 639–642. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1171176>.
- Sevigny, J. *et al.* (2015) 'O4-04-05: Aducanumab (BIIB037), an anti-amyloid beta monoclonal antibody, in patients with prodromal or mild Alzheimer's disease: Interim results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1b study', *Alzheimer's & Dementia*, 11(7S_Part_6). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.07.367>.

- Sevigny, J. *et al.* (2016) 'The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease', *Nature*, 537(7618), pp. 50–56. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19323>.
- Sgourakis, N.G. *et al.* (2007) 'The Alzheimer's Peptides A β 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study', *Journal of Molecular Biology*, 368(5), pp. 1448–1457. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.093>.
- Shankar, G.M. *et al.* (2007) 'Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway', *The Journal of Neuroscience*, 27(11), pp. 2866–2875. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007>.
- Shankar, G.M. *et al.* (2008) 'Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory', *Nature Medicine*, 14(8), pp. 837–842. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm1782>.
- Shi, F. *et al.* (2009) 'Hippocampal volume and asymmetry in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Meta-analyses of MRI studies', *Hippocampus*, 19(11), pp. 1055–1064. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.20573>.
- Shimizu, H. *et al.* (2008) 'Crystal Structure of an Active Form of BACE1, an Enzyme Responsible for Amyloid β Protein Production', *Molecular and Cellular Biology*, 28(11), pp. 3663–3671. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.02185-07>.
- Siddoway, B., Hou, H. and Xia, H. (2011) 'Glutamatergic Synapses: Molecular Organisation', in John Wiley & Sons, Ltd (ed.) *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. a0000235.pub2. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000235.pub2>.
- Sieghart, W. *et al.* (1999) 'Structure and subunit composition of GABA_A receptors', *Neurochemistry International*, 34(5), pp. 379–385. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(99\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(99)00045-5).
- Silvestre, J.S. and Prous, J. (2005) 'Research on adverse drug events. I. Muscarinic M3 receptor bindingaffinity could predict the risk of antipsychotics to induce type

- 2diabetes', *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(5), p. 289. Available at: <https://doi.org/10.1358/mf.2005.27.5.908643>.
- Simard, C.F. *et al.* (2007) 'Homooligomeric and Heterooligomeric Associations between K⁺-Cl⁻ Cotransporter Isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ Cotransporters', *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), pp. 18083–18093. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M607811200>.
- Skoog, I. and Gustafson, D. (2006) 'Update on hypertension and Alzheimer's disease', *Neurological Research*, 28(6), pp. 605–611. Available at: <https://doi.org/10.1179/016164106X130506>.
- Sloviter, R. (1999) 'Localization of GABAB (R1) receptors in the rat hippocampus by immunocytochemistry and high resolution autoradiography, with specific reference to its localization in identified hippocampal interneuron subpopulations', *Neuropharmacology*, 38(11), pp. 1707–1721. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(99\)00132-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00132-X).
- Sluimer, J.D. *et al.* (2008) 'Whole-brain atrophy rate in Alzheimer disease: Identifying fast progressors', *Neurology*, 70(19_part_2), pp. 1836–1841. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000311446.61861.e3>.
- Smalley, J.L. *et al.* (2020) 'Isolation and Characterization of Multi-Protein Complexes Enriched in the K-Cl Co-transporter 2 From Brain Plasma Membranes', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, p. 563091. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.563091>.
- Snyder, E.M. *et al.* (2005) 'Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-β', *Nature Neuroscience*, 8(8), pp. 1051–1058. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1503>.
- Sorrells, S.F. *et al.* (2018) 'Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults', *Nature*, 555(7696), pp. 377–381. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature25975>.

- Soscia, S.J. *et al.* (2010) 'The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide', *PLoS ONE*. Edited by A.I. Bush, 5(3), p. e9505. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>.
- Spencer, R.L. and Bland, S.T. (2019) 'Hippocampus and Hippocampal Neurons', in *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*. Elsevier, pp. 57–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00005-9>.
- Sperling, R. (2007) 'Functional MRI Studies of Associative Encoding in Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1097(1), pp. 146–155. Available at: <https://doi.org/10.1196/annals.1379.009>.
- Spires-Jones, T. and Knafo, S. (2012) 'Spines, Plasticity, and Cognition in Alzheimer's Model Mice', *Neural Plasticity*, 2012, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1155/2012/319836>.
- Strittmatter, W.J. *et al.* (1993) 'Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease'.
- Sunderland, T. *et al.* (1989) 'Clock Drawing in Alzheimer's Disease: A Novel Measure of Dementia Severity', *Journal of the American Geriatrics Society*, 37(8), pp. 725–729. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1989.tb02233.x>.
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P. and Zlokovic, B.V. (2018) 'Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders', *Nature Reviews Neurology*, 14(3), pp. 133–150. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>.
- Takahashi, K. *et al.* (2015) 'Restored glial glutamate transporter EAAT2 function as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease', *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), pp. 319–332. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20140413>.
- Talantova, M. *et al.* (2013) ' $A\beta$ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss', *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 110(27). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>.
- Tan, J.Z.A. and Gleeson, P.A. (2019) 'The trans-Golgi network is a major site for α -secretase processing of amyloid precursor protein in primary neurons', *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), pp. 1618–1631. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005222>.
- Tanner, J.A. *et al.* (2022) 'Amyloid, tau and metabolic PET correlates of cognition in early and late-onset Alzheimer's disease', *Brain*, 145(12), pp. 4489–4505. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/awac229>.
- Taylor, H.A. *et al.* (2022) 'BACE1: More than just a β -secretase', *Obesity Reviews*, 23(7). Available at: <https://doi.org/10.1111/obr.13430>.
- Teich, A.F., Patel, M. and Arancio, O. (2013) 'A Reliable Way to Detect Endogenous Murine β -Amyloid', *PLoS ONE*. Edited by C. Combs, 8(2), p. e55647. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055647>.
- Terreros-Roncal, J. *et al.* (2023) 'Methods to study adult hippocampal neurogenesis in humans and across the phylogeny', *Hippocampus*, 33(4), pp. 271–306. Available at: <https://doi.org/10.1002/hipo.23474>.
- Thal, D.R. *et al.* (2002) 'Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD'.
- Theunis, C. *et al.* (2013) 'Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy', *PLoS ONE*. Edited by K.M. Iijima, 8(8), p. e72301. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>.
- Thompson, C.L. and Stephenson, F.A. (1994) 'GABA_A Receptor Subtypes Expressed in Cerebellar Granule Cells: A Developmental Study'.
- Toh, W.H. *et al.* (2017) 'Amyloid precursor protein traffics from the Golgi directly to early endosomes in an Arl5b- and AP4-dependent pathway', *Traffic*, 18(3), pp. 159–175. Available at: <https://doi.org/10.1111/tra.12465>.

- Tomiyama, T. and Shimada, H. (2020) 'APP Osaka Mutation in Familial Alzheimer's Disease—Its Discovery, Phenotypes, and Mechanism of Recessive Inheritance', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), p. 1413. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21041413>.
- Tyzio, R. *et al.* (2006) 'Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain During Delivery', *Science*, 314(5806), pp. 1788–1792. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1133212>.
- Uvarov, P. *et al.* (2007) 'A Novel N-terminal Isoform of the Neuron-specific K-Cl Cotransporter KCC2', *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), pp. 30570–30576. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705095200>.
- Uvarov, P. *et al.* (2009) 'Coexpression and Heteromerization of Two Neuronal K-Cl Cotransporter Isoforms in Neonatal Brain', *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp. 13696–13704. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M807366200>.
- Valiukas, Z. *et al.* (2022) 'Immunotherapies for Alzheimer's Disease—A Review', *Vaccines*, 10(9), p. 1527. Available at: <https://doi.org/10.3390/vaccines10091527>.
- Verkhatsky, A. *et al.* (2014) 'Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases', *Biochemical Society Transactions*, 42(5), pp. 1291–1301. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20140107>.
- Vignes, M. and Collingridge, G.L. (1997) 'The synaptic activation of kainate receptors', *Nature*, 388(6638), pp. 179–182. Available at: <https://doi.org/10.1038/40639>.
- Von Bartheld, C.S., Bahney, J. and Herculano-Houzel, S. (2016) 'The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting', *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), pp. 3865–3895. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.24040>.
- Vossel, K.A. *et al.* (2016) 'Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease: Subclinical Epileptiform Activity in AD', *Annals of Neurology*, 80(6), pp. 858–870. Available at: <https://doi.org/10.1002/ana.24794>.

- Vossel, K.A. *et al.* (2017) 'Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance', *The Lancet Neurology*, 16(4), pp. 311–322. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30044-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30044-3).
- Walls, A.B. *et al.* (2015) 'The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism', *Neurochemical Research*, 40(2), pp. 402–409. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1473-1>.
- Walsh, D.M. and Selkoe, D.J. (2020) 'Amyloid β -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease', *Current Opinion in Neurobiology*, 61, pp. 116–124. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.02.003>.
- Wang, W., Gong, N. and Xu, T.-L. (2006) 'Downregulation of KCC2 following LTP contributes to EPSP–spike potentiation in rat hippocampus', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(4), pp. 1209–1215. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.038>.
- Wang, Z. *et al.* (2017) 'Human Brain-Derived A β Oligomers Bind to Synapses and Disrupt Synaptic Activity in a Manner That Requires APP', *The Journal of Neuroscience*, 37(49), pp. 11947–11966. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2009-17.2017>.
- Wang, Z.-C., Zhao, J. and Li, S. (2013) 'Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- β ', *Neuroscience Bulletin*, 29(6), pp. 752–760. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1383-2>.
- Watanabe, M. *et al.* (2009) 'Clustering of Neuronal K⁺-Cl⁻ Cotransporters in Lipid Rafts by Tyrosine Phosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), pp. 27980–27988. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.043620>.
- Wenz, M. *et al.* (2009) 'CIP1 is an activator of the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), pp. 388–392. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.057>.

- Wright, R. *et al.* (2017) 'Neuronal Chloride Regulation via KCC2 Is Modulated through a GABA_B Receptor Protein Complex', *The Journal of Neuroscience*, 37(22), pp. 5447–5462. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2164-16.2017>.
- Yamada, J. *et al.* (2004) 'Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1', *The Journal of Physiology*, 557(3), pp. 829–841. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062471>.
- Yamamoto, K. *et al.* (2015) 'Chronic Optogenetic Activation Augments A β Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease', *Cell Reports*, 11(6), pp. 859–865. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.017>.
- Yan, S. *et al.* (2020) 'Multiparametric imaging hippocampal neurodegeneration and functional connectivity with simultaneous PET/MRI in Alzheimer's disease', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 47(10), pp. 2440–2452. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04752-8>.
- Yankner, B.A., Duffy, L.K. and Kirschner, D.A. (1990) 'Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid β Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides', *Science, New Series*, 250(4978), pp. 279–282.
- Yu, W. *et al.* (2007) 'Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 36(4), pp. 484–500. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.08.008>.
- Zhang, J. *et al.* (2020) 'Staurosporine and NEM mainly impair WNK-SPAK/OSR1 mediated phosphorylation of KCC2 and NKCC1', *PLOS ONE*. Edited by J.-C. Dussaule, 15(5), p. e0232967. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232967>.
- Zhao, B. *et al.* (2008) 'Identification of a novel di-leucine motif mediating K⁺/Cl⁻ cotransporter KCC2 constitutive endocytosis', *Cellular Signalling*, 20(10), pp. 1769–1779. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.011>.
- Zhao, J. (2011) 'The contribution of activated astrocytes to Ab production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis'.

Références

- Zheng, H. and Koo, E.H. (2011) 'Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein', *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), p. 27. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-27>.
- Zhou, B. *et al.* (2022) 'Synaptogenic effect of APP -Swedish mutation in familial Alzheimer's disease', *Science Translational Medicine*, 14(667), p. eabn9380. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn9380>.
- Zott, B. *et al.* (2019) 'A vicious cycle of b amyloid– dependent neuronal hyperactivation'.

Résumé :

La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection neurodégénérative qui constitue la forme la plus fréquente de démence. Elle se distingue par une longue phase asymptomatique, durant laquelle des dysfonctionnements de la neurotransmission ont été observés. Ces perturbations sont attribuées à une accumulation précoce et anormale des formes oligomériques de la protéine bêta-amyloïde ($A\beta_0$) dans le cerveau, en particulier au niveau de l'hippocampe. Issues du clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP), les $A\beta_0$ perturbent la neurotransmission en altérant l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition (E/I), favorisant ainsi une hyperactivité neuronale. Ces effets délétères sur la transmission glutamatergique semblent liés à l'interaction entre $A\beta$ et la synapse via l'APP. Bien que moins documentée, l'implication de l'APP dans la modulation de la transmission inhibitrice, notamment via l'expression du transporteur de chlore KCC2, est également suggérée par certaines études.

Les recherches menées dans le cadre de ma thèse ont mis en évidence une altération précoce de l'équilibre E/I due à une surproduction d' $A\beta_0$, principalement attribuable à une réduction de la neurotransmission inhibitrice dans l'hippocampe. Ce déficit est associé à un clivage excessif de l'APP et à une diminution de l'expression de KCC2. De plus, il a été démontré qu'un traitement pharmacologique visant à augmenter la fonction de KCC2 pourrait rétablir cet équilibre en corrigeant les perturbations de la transmission GABAergique. En résumé, ces résultats ont permis d'identifier un mécanisme complexe dans lequel KCC2 joue un rôle central dans la régulation de la balance E/I, ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.

Abstract :

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition and the most common form of dementia. It is characterized by a long asymptomatic phase during which neurotransmission dysfunctions have been observed. These disturbances are attributed to the early and abnormal accumulation of oligomeric forms of the beta-amyloid protein ($A\beta_0$) in the brain, particularly in the hippocampus. Derived from the cleavage of the amyloid precursor protein (APP), $A\beta_0$ disrupts neurotransmission by altering the balance between excitation and inhibition (E/I), thus promoting neuronal hyperactivity. These deleterious effects on glutamatergic transmission appear to be linked to the interaction between $A\beta$ and the synapse via APP. Although less documented, APP's involvement in the modulation of inhibitory transmission, particularly through the expression of the KCC2 chloride transporter, is also suggested by some studies.

The research conducted as part of my thesis highlighted an early alteration in the E/I balance due to an overproduction of $A\beta_0$, mainly attributable to a reduction in inhibitory neurotransmission in the hippocampus. This deficit is associated with excessive cleavage of APP and a decrease in KCC2 expression. Moreover, it has been demonstrated that pharmacological treatment aimed at increasing KCC2 function could restore this balance by correcting disturbances in GABAergic transmission. In summary, these findings helped identify a complex mechanism in which KCC2 plays a central role in regulating the E/I balance, paving the way for new therapeutic approach.

