



HAL
open science

Evaluation du canal calcique TRPA1 comme cible thérapeutique potentielle dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

Adrien Paumier

► **To cite this version:**

Adrien Paumier. Evaluation du canal calcique TRPA1 comme cible thérapeutique potentielle dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV010 . tel-03130106

HAL Id: tel-03130106

<https://theses.hal.science/tel-03130106v1>

Submitted on 3 Feb 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neurosciences - Neurobiologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Adrien PAUMIER

Thèse dirigée par **Mireille ALBRIEUX**

préparée au sein du **Laboratoire Grenoble Institut des Neurosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Evaluation du canal calcique TRPA1 comme cible thérapeutique potentielle dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

Evaluation of the calcium channel TRPA1 as a potential therapeutic target in the pathogenesis of Alzheimer's disease

Thèse soutenue publiquement le **29 septembre 2020**,
devant le jury composé de :

Madame MIREILLE ALBRIEUX

MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,
Directrice de thèse

Madame AUDE PANATIER

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS DELEGATION AQUITAINE,
Rapporteuse

Monsieur DAVID BLUM

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION NOR-DOUEST,
Rapporteur

Monsieur GILLES BONVENTO

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA DE FONTENAY-AUX-ROSES,
Examineur

Monsieur REMY SADOUL

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,
Président



REMERCIEMENTS

« Le début est la fin, et la fin est le début » (Adam, *Dark*)

Ces lignes de remerciements sont les premières qui seront lues, alors que ce sont les dernières que j'écris lors de la rédaction de ce manuscrit. A l'heure du bilan, elles me permettent d'être reconnaissant envers les personnes qui m'ont permis d'atteindre l'accomplissement professionnel et personnel que représente la thèse.

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Les docteurs **Aude Panatier** et **David Blum**, en qualité de rapporteurs, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter l'évaluation du présent manuscrit. Le docteur **Gilles Bonvento**, en qualité d'examineur mais également en tant que membre de mon comité de suivi de thèse. Merci également pour les conseils et le soutien apportés dans ma recherche de post-doc. Le professeur **Rémy Sadoul**, en qualité d'examineur et en qualité d'enseignant. Sur un plan plus personnel, j'aimerais te remercier pour un « coup de gueule » que tu as poussé lors d'un cours de première année de master face à la passivité des étudiants que tu avais en face de toi. Ce jour-là, j'ai eu un déclic qui m'a fait passer de spectateur à acteur de ma formation et aujourd'hui je suis ravi que tu sois présent pour le parachèvement de mon parcours d'étudiant.

J'aimerais bien entendu adresser des remerciements tous particuliers à mon encadrante, **Mireille Albrieux**. Si Rémy a permis l'étincelle, toi tu as su attiser les flammes pour me permettre de nourrir une réelle passion pour le sujet, le projet, la recherche et aussi simplement pour le fait de travailler avec toi. Malgré toutes les difficultés qu'on a pu traverser au labo ou celles que j'ai traversées dans ma vie personnelle, tu as toujours su trouver les mots pour m'aider et pour maintenir ma motivation intacte. Pour décrire la relation entre un encadrant et son thésard, j'ai toujours eu l'image en tête d'un chevalier jedi et de son padawan. J'aime à penser que si Anakin Skywalker avait eu un mentor comme toi, on n'aurait pas attendu six films pour voir la lumière triompher du côté obscur de la Force. Tu es de ces rencontres qui changent une vie et aujourd'hui, grâce à toi, j'aborde la suite avec confiance. Un énorme merci pour tout.

Je tiens à remercier particulièrement mon prédécesseur **Anthony Bosson**. Sur le plan professionnel, tu as largement contribué à me donner toutes les clés nécessaires pour aller décrocher ma bourse doctorale, afin de prendre le relai et continuer le projet que tu as initié. Sur le plan personnel, c'est un véritable ami que j'ai découvert au labo et en dehors. Avec **Delphine**, vous avez toujours été d'un grand soutien pour moi et vous l'êtes encore aujourd'hui

malgré les 5000 km qui nous séparent. Les *after-work* au Hasard me manquent... Je vous souhaite plein de bonheur dans la suite de votre aventure canadienne et vu qu'on se trouvera peut-être bientôt sur le même continent j'espère qu'on se verra plus souvent.

Un grand merci également à l'ensemble de l'équipe pour m'avoir permis d'effectuer mes stages et ma thèse dans d'excellentes conditions. **Alain Buisson**, pour m'avoir accueilli dans ton équipe, pour ton accessibilité, pour les longues discussions de fin de journée qui m'ont toujours permis de prendre du recul sur mes travaux et pour les matchs de soccer five. **Sylvie Boisseau**, pour toute ton aide sur le projet, on peut toujours compter sur toi et sur la grande qualité de ton travail, même en période de *rush*. Merci aussi pour ta gentillesse et ta bonne humeur permanente. **Muriel Jacquier-Sarlin**, pour ta grande bienveillance à mon égard depuis mes tous premiers pas au sein du laboratoire. J'espère qu'on aura l'occasion de faire la descente de la Meije ensemble et manger une raclette à la Grave, avant que la neige ne devienne qu'un lointain souvenir pour moi. **Fabien Lanté**, pour avoir partagé le bureau et la salle d'électrophysio avec toi, toujours dans la bonne humeur, agrémentée de discussions aux tonalités chantantes. Un merci général pour les autres membres de l'équipe passés, présents et futurs qui contribuent à cette bonne ambiance de travail qui fait qu'on se sent bien dans cette équipe.

Merci à **Elodie Fino**, pour tes conseils avisés en tant que membre de mon comité de suivi de thèse mais également pour ton aide quand j'ai eu de gros doutes sur une poursuite de carrière dans la recherche académique. Le retour aux sources dans le sud va vous faire beaucoup de bien à Maxime et toi.

Je remercie également **Aurélie**, d'avoir été à mes côtés durant une bonne partie de cette thèse et d'avoir continué d'être un soutien au sein du labo après. Bon courage à toi pour la suite, je sais que plein de belles choses t'attendent.

J'aimerais remercier **Sébastien Carnicella**, pour avoir été un super *training partner* que ce soit à la salle de sport ou sur les trails. Merci également pour toujours avoir été de bons conseils sur les différents problèmes que j'ai pu rencontrer au labo.

Pour terminer avec les gens du GIN, j'aimerais remercier d'abord les copains. Je pense à **Camille, Robin, Charlotte et Max** pour tous les moments de relâche qui font du bien, que ce soit juste pour un café sur la terrasse ou une soirée un peu trop arrosée qui se termine en ayant refait le monde. Vous êtes des gens formidables, force à vous pour la fin de vos thèses ! J'aimerais également remercier, tous les gens de cet institut avec qui j'ai pu partager des bons moments et qui ont participé à rendre mon aventure au GIN formidable sur le plan humain. J'ai

peur d'oublier plein de monde mais je pense à **Nagham, Céline**, toute la bande du soccer, **Noémie, Julia**, le groupe des zootechs, l'incontournable **Georges, Perrine, Julie, Gisela, Eve, Hélène, Julie-Anne, Amandine**... merci à tous !

En dehors du labo, j'aimerais dire merci à tous les amis. A ma meilleure amie et binôme de choc en soirée **Sarah**, avec **Flo** vous avez toujours été là pour moi et je sais que le post-doc n'y changera rien. Et à la bande du master avec qui on a su garder le lien malgré la thèse et malgré les années : **Axel, Jérôme, Razak** et **Floriane**.

Enfin merci à la famille, qui a été d'un soutien indéfectible et qui m'a permis d'arriver jusqu'ici. J'espère que vous serez fiers de moi, même si je me doute que la soutenance risque d'être un peu longue pour vous.

Je retiens énormément de choses positives de ces presque 5 années passées, alors je finirais simplement en disant merci tout le monde et au plaisir de vous revoir à Grenoble ou ailleurs.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	5
PREAMBULE.....	7
INTRODUCTION.....	9
PREMIERE PARTIE : LA MALADIE D'ALZHEIMER	9
A. Généralités.....	9
B. Epidémiologie	10
1. Formes familiales de la maladie.....	10
2. Facteurs de risque.....	11
C. Physiopathologie de la maladie.....	12
1. Stades cliniques	12
2. Stades précliniques	16
a. Signes annonciateurs de la maladie	16
b. Excitotoxicité.....	19
c. Implication des récepteurs NMDA.....	22
D. Rôle du peptide A β	28
1. Rôle physiologique d'A β	29
2. A β o et synaptotoxicité.....	30
a. Perturbation de la signalisation glutamatergique.....	30
b. Modification de la plasticité synaptique à long terme	32
E. Modèles murins de la maladie d'Alzheimer	35
1. Modèles basés sur la surproduction d'A β	35
2. Modèle APP/PS1-21	38
3. Phase cellulaire chez les modèles murins	40
F. Traitements de la maladie d'Alzheimer	41
1. Réduction de l'accumulation d'A β	42

a.	Immunothérapie.....	42
b.	Inhibition des sécrétases	43
2.	Réduction de l'hyperactivité neuronale.....	43
DEUXIEME PARTIE : LES ASTROCYTES		45
A.	Présentation générale des astrocytes	45
B.	Principales fonctions homéostatiques astrocytaires	48
1.	Homéostasie ionique et osmolarité	48
2.	Barrière hémato-encéphalique et contrôle du flux sanguin.....	50
3.	Système glymphatique	51
4.	Réaction inflammatoire	52
C.	Interactions neurones-astrocytes	54
1.	Contrôle du métabolisme énergétique.....	54
2.	Régulation de la connectivité synaptique.....	56
a.	Synaptogenèse	57
b.	Stabilisation et maturation	58
c.	Élimination	59
3.	Synapse tripartite.....	60
a.	Homéostasie des neurotransmetteurs.....	60
b.	Gliotransmission.....	61
c.	Implication des astrocytes dans la plasticité et la mémoire.....	65
D.	Signalisation calcique astrocytaire	66
1.	Excitabilité calcique	66
2.	Acteurs de la signalisation calcique astrocytaire.....	70
a.	Vue d'ensemble	70
b.	Canal TRPA1.....	72
E.	Astrocytes et maladie d'Alzheimer	75
1.	Stades avancés et astrogliose.....	75

2.	Stades précoces et physiologie astrocytaire	79
3.	Astrocyte et peptide A β	79
OBJECTIFS	83
METHODES	85
A.	Mesure de l'activité électrophysiologique neuronale spontanée.....	85
1.	<i>Patch-clamp</i> en configuration cellule entière.....	85
2.	Mesure des courants spontanés	86
B.	Mesure de l'activité calcique dans les microdomaines astrocytaires	88
C.	Inhibition chronique du canal TRPA1 chez la souris.....	89
D.	Evaluation de la mémoire spatiale chez la souris par le labyrinthe de Barnes.....	90
RESULTATS	93
Implication du canal TRPA1 dans l'hyperactivité calcique astrocytaire et les dysfonctions synaptiques induites par A β		93
Effet de l'inhibition chronique du canal TRPA1 chez les souris APP/PS1		115
Etude des mécanismes associés à la perturbation des interactions entre astrocytes et neurones induite par A β		155
DISCUSSION	161
A.	Expression du canal TRPA1	161
B.	Perturbations de la plasticité et des performances mnésiques.....	163
C.	Perturbations de la balance excitation/inhibition	165
D.	Vers un diagnostic de plus en plus précoce.....	166
E.	Perspectives	168
1.	Etude des mécanismes impliqués dans le déclenchement de l'hyperactivité neuronale précoce.....	168
2.	Etude de l'activation de TRPA1 par A β	171
F.	Hypothèses évolutives d'un rôle de premier plan pour l'astrocyte dans les troubles cognitifs.....	171
G.	Conclusion.....	173

REFERENCES.....	175
ANNEXES	201

ABREVIATIONS

3xTg – modèle triple transgénique (APP/PS1/tau)

A β – peptide β -amyloïde

A β _o – oligomères d'A β

AMPA – alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolepropionic acide

APOE – apolipoprotéine E

APP – *amyloid precursor protein*

APP/PS1 – modèle murin avec insertion de gènes mutés pour APP et PS1

AQP4 – aquaporine 4

Best-1 – Bestrophine-1

BHE – barrière hémato-encéphalique

CA1 – *Cornu Ammonis 1*

EAAT – *excitatory amino-acid transporter*

fEPSP – *field excitatory post-synaptic potential*

GFAP – *glial fibrillary acidic protein*

GLAST – *glutamate aspartate transporter*

GLT-1 – *glutamate transporter 1*

iGluR – récepteur ionotropique du glutamate

IP₃ – inositol triphosphate

KO – *knock-out*

LCS – liquide cérébro-spinal

LTD – *long term depression*

LTP – *long term potentiation*

MCI – *mild cognitive impairments*

mGluR – récepteur métabotrope du glutamate

NMDA – N-méthyl-D-aspartate

NCX – échangeur sodium calcium

PAP – *perisynaptic astrocytic process*

PET-scan – tomographie par émission de positrons

PS1 – préséniline 1

sEPSC – *spontaneous excitatory post-synaptic current*

SIC – *slow inward current*

SNC – système nerveux central

tau - *tubulin-associated unit*

Thy-1 – *thymocyte differentiation antigen 1*

TRPA1 – *transient receptor potential ankyrin 1*

TTX – tétrodotoxine

WT – *wild type*

PREAMBULE

« On peut également imaginer que l'amnésie, le manque d'associations de pensées, le retard et la démence peuvent résulter de l'affaiblissement des synapses entre les neurones à la suite d'un état plus ou moins pathologique, c'est-à-dire lorsque les prolongements s'atrophient et ne forment plus de contacts, lorsque les zones mnémoniques ou d'association corticales subissent une désorganisation partielle. » (Ramón y Cajal, 1911).

A travers ces mots qui ont plus de cent ans, Ramón y Cajal imaginait déjà que l'origine des démences pouvait venir d'un dysfonctionnement des synapses, qui sont la zone de communication entre les neurones. Aujourd'hui la maladie d'Alzheimer constitue la principale cause de démence liée à l'âge et à l'heure où la population est vieillissante grâce à l'augmentation de l'espérance de vie, la compréhension de cette maladie représente un challenge socio-économique majeur. Cependant, même si l'hypothèse de Cajal s'est avérée juste et qu'aujourd'hui les dysfonctions synaptiques sont considérées comme prélude à la neurodégénérescence, les mécanismes exacts qui en sont à l'origine sont toujours mal compris.

Ce travail de thèse a pour but d'apporter une nouvelle piste pour la compréhension de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer en s'intéressant au rôle des astrocytes. Les astrocytes sont un type de cellules du cerveau appartenant au groupe des cellules gliales. Longtemps considérées comme des cellules de soutien associées au support métabolique des neurones, il a fallu attendre la fin du 20^{ème} siècle pour associer ces cellules au fonctionnement des synapses avec l'émergence du concept de la synapse tripartite. Depuis, il est largement admis que l'astrocyte constitue un partenaire d'interaction à part entière au niveau de cette structure de communication intercellulaire. Ainsi, l'astrocyte contrôle l'homéostasie de la synapse et dispose de la capacité de moduler la transmission du message nerveux. On peut donc aisément imaginer qu'un dysfonctionnement astrocytaire peut impacter les synapses et conduire à un processus neurodégénératif. Auquel cas, l'astrocyte pourrait alors constituer une cible thérapeutique intéressante dans le but d'empêcher ou d'endiguer ce processus. Au travers de ce travail de thèse nous avons donc étudié l'implication des astrocytes dans les dysfonctions synaptiques chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et évalué ces cellules en tant que potentielle cible thérapeutique neuroprotectrice chez ces animaux.

PREMIERE PARTIE : LA MALADIE D'ALZHEIMER

A. Généralités

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui porte le nom du médecin allemand, Alois Alzheimer, qui en a fait la description pour la première fois en 1907 à la suite de ses observations sur une patiente Auguste Deter (Maurer, Volk and Gerbaldo 1997). Cette patiente âgée de 51 ans présentait une importante altération des fonctions mnésiques et cognitives. Par ailleurs l'analyse *post-mortem* de son cerveau a permis de mettre en évidence

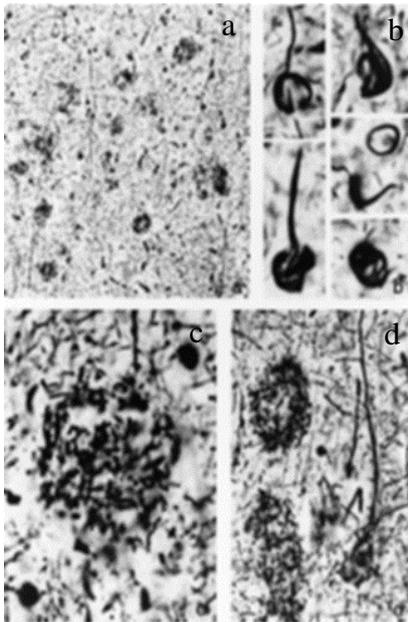


Figure 1: Coupes de cortex d'Auguste Deter colorées selon Bielschowsky. a Un grand nombre de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires colorés en noir. Des exemples d'enchevêtrements sont représentés en b, alors que des plaques amyloïdes contenant des neurites anormales sont décrites en c et d. Grossissement x20 (a) et x63 (b - d). (Graeber *et al.* 1998)

une forte atrophie cérébrale ainsi que deux lésions caractéristiques de la maladie que sont les plaques amyloïdes, également appelées plaques séniles, et les enchevêtrements neurofibrillaires (**Figure 1**) (Graeber *et al.* 1998). Ces lésions sont constituées respectivement du peptide β -amyloïde ($A\beta$) (Glenner and Wong 1984) et de la protéine tau (Kosik, Joachim and Selkoe 1986). Même si les causes exactes de l'accumulation de ces protéines restent mal connues, il semblerait que des facteurs génétiques et environnementaux y contribuent.

Les premiers symptômes remarquables sont des pertes de mémoire qui affectent en premier lieu la mémoire à court terme et qui apparaissent en moyenne autour de 65 ans. Puis, avec la progression de l'atteinte neurologique, les pertes de mémoire s'accroissent et finissent par atteindre la mémoire à long terme. L'altération des fonctions cognitives rend l'accomplissement de tâches du quotidien de plus en plus difficile (Hoe *et al.* 2006). Dans les stades les plus

avancés, les patients présentent une perte d'autonomie totale. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la maladie d'Alzheimer.

Cette maladie touche environ 900 000 personnes en France. Ce chiffre pourrait atteindre 1,2 millions de cas en 2020 étant donné qu'on recense environ 225 000 nouveaux cas chaque année. On estime à 22 099 € par an le coût moyen consacré à la prise en charge médicale et médico-sociale d'un patient (chiffres de la fondation France Alzheimer). La compréhension de cette maladie constitue donc un enjeu médical et socio-économique majeur.

B. Epidémiologie

1. Formes familiales de la maladie

Il existe des formes héréditaires ou dites familiales de la maladie d'Alzheimer qui se caractérisent par une manifestation précoce des premiers symptômes. Bien que ne correspondant qu'à moins de 5 % des cas, ces formes ont permis d'identifier des mutations sur trois gènes : *amyloid precursor protein* (APP), *presenilin 1* (PS1) et *presenilin 2* (PS2) (Selkoe 2011). Les mutations considérées comme pathogènes pour ces trois gènes sont toutes impliquées dans une augmentation de la production d'A β (Walsh and Selkoe 2007).

De manière intéressante, malgré la forte présence d'enchevêtrements neurofibrillaires, aucune mutation de la protéine tau n'a été reportée dans ces formes familiales (Reitz and Mayeux 2014). En revanche, des mutations de tau ont été observées dans des formes plus larges de démences regroupées sous le terme général de « tauopathies », qui ne s'accompagnent de plaques amyloïdes que dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Spillantini *et al.* 1998). A l'inverse, il a été reporté dans certains rares cas de la maladie d'Alzheimer, des cerveaux présentant une grande quantité de plaques séniles, mais très peu d'enchevêtrements neurofibrillaires (Selkoe 2011). De plus, les travaux Götz *et al.* 2001 ont montré que l'injection de peptide A β dans le cerveau de souris surexprimant une forme humaine de tau permettait d'accélérer sa phosphorylation et la formation des enchevêtrements neurofibrillaires. Ces observations suggèrent ainsi que, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de tau serait une conséquence de la production anormale d'A β (Selkoe 2011).

D'autre part, le gène de l'APP se trouve sur le chromosome 21. Ainsi, dans la population des personnes atteintes du syndrome de Down (plus communément appelé « Trisomie 21 »), on observe une prévalence de la maladie d'Alzheimer bien supérieure à celle de la population générale avec un âge moyen d'apparition autour de 54 ans (Castro, Zaman and Holland 2017). Ces observations soutiennent donc l'hypothèse amyloïde qui décrit la surproduction du peptide

A β comme élément déclencheur de la pathologie, on parle alors de cascade amyloïde (Selkoe 1991; Hardy JA and GA. 1992). Cette hypothèse place le peptide β -amyloïde au centre des recherches pour comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la maladie.

2. Facteurs de risque

Les formes non-familiales ou sporadiques de la maladie d'Alzheimer constituent la grande majorité des cas et s'appuient probablement sur une origine multifactorielle en lien avec différents facteurs de risques (Reitz and Mayeux 2014). Le principal facteur de risque de la maladie étant l'âge puisqu'il s'agit d'une maladie du vieillissement qui apparaît en moyenne vers 65 ans.

Le principal facteur de risque après l'âge est génétique et concerne le gène de l'apolipoprotéine E (APOE) qui est retrouvé sous trois isoformes chez l'homme $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. La prévalence dans la population générale de ces isoformes sont respectivement d'environ 7-8 %, 75-80 % et 14-15 % (Schipper 2011). Dans le cerveau, cette protéine est en premier lieu produite par les astrocytes et joue un rôle essentiel dans le transport des lipides. Le fait de porter un allèle $\epsilon 4$ augmenterait de 2 à 3 fois les risques de développer la maladie d'Alzheimer et de 12 fois dans le cas d'une homozygotie (Mahoney-Sanchez *et al.* 2016). Ainsi, un exemplaire de l'allèle $\epsilon 4$ diminuerait l'âge d'apparition de la maladie de 5 ans et deux exemplaires de 10 ans environ (Yu, Tan and Hardy 2014). A l'inverse, l'allèle $\epsilon 2$ semble quant à lui avoir un effet protecteur vis-à-vis de la maladie. Les mécanismes exacts permettant de relier le rôle d'APOE à la pathogénèse de la maladie font à l'heure actuelle encore débat. Cependant, une des hypothèses propose un rôle d'APOE dans la clairance du peptide A β , qui serait moins efficiente dans le cas de la présence de l'allèle $\epsilon 4$ (Castellano *et al.* 2011) et qui pourrait expliquer l'accumulation du peptide dans la cadre des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer (**Figure 2**).

Au-delà des facteurs génétiques, il a été reporté une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer en lien avec des pathologies cardiovasculaires comme les AVC, la fibrillation auriculaire, les maladies coronariennes ou l'insuffisance cardiaque (FAG de Bruijn and Ikram 2014). La mauvaise perfusion du tissu cérébral due à ces pathologies pourrait être impliquée, là encore, dans la mauvaise clairance du peptide A β et participer à son accumulation dans le cerveau. Parmi les facteurs de risque, on retrouve également le diabète (Baglietto-Vargas *et al.* 2016), la consommation de certains médicaments comme les anxiolytiques et notamment les benzodiazépines (Biétry *et al.* 2017) ou encore des facteurs environnementaux comme l'exposition à certains métaux comme le mercure (Hock *et al.* 1998) ou l'aluminium

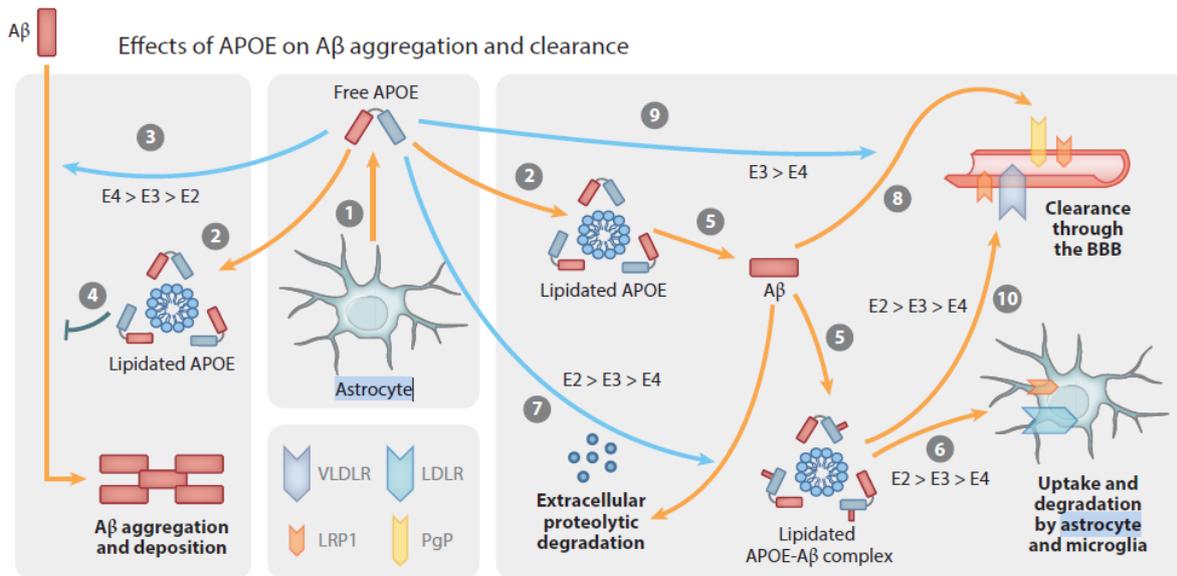


Figure 2 : Effet d'APOE sur l'agrégation et la clairance d'Aβ. Dans le cerveau APOE est produit par les astrocytes (1), puis associé à des lipides pour former des complexes de lipoprotéines (2). APOE pourrait accélérer l'agrégation et le dépôt d'Aβ dépendamment de l'isoforme (3). Cependant, le niveau de transformation d'APOE en lipoprotéine pourrait également diminuer le niveau d'Aβ dans le cerveau (4). Dans l'espace extracellulaire, APOE associé à des lipides est capable de lier l'Aβ soluble et de le transporter dans le système nerveux central (5). APOE pourrait également faciliter la recapture et la dégradation d'Aβ par les astrocytes ou la microglie à travers l'endocytose de complexes associant lipides - APOE - Aβ (6). APOE participe également à la protéolyse extracellulaire d'Aβ (7). Au niveau de la barrière hématoencéphalique (BHE), Aβ soluble est majoritairement transporté par les complexes de lipoprotéines depuis le liquide interstitiel vers la circulation sanguine (8). Mais APOE seul peut aussi directement faciliter le transport d'Aβ à travers la BHE dépendamment de l'isoforme du gène de l'APOE (9). Les complexes APOE2-Aβ et APOE3-Aβ font l'objet d'une clairance au niveau de la BHE plus rapide que les complexes APOE4-Aβ (10). BBB, blood brain barrier ; VLDLR, very low density lipoprotein receptor; LDLR, low density receptor ; LRP1, LDL receptor related protein 1 ; PgP, P-glycoprotein (Adapté de Yu, Tan and Hardy 2014).

(Rondeau, Commenges and Jacqmin-gadda 2000). En somme, l'étiologie de la maladie d'Alzheimer est complexe, mais il semblerait qu'une mauvaise hygiène de vie d'une manière générale favorise l'apparition de certains troubles comme ceux mentionnés ci-dessus, et constituerait un terrain favorable pour l'apparition de cette maladie *via* une diminution de la clairance d'Aβ (pour revue voir Reitz and Mayeux 2014). Par opposition, une bonne hygiène de vie associée à des activités sociales et intellectuelles stimulantes d'un point de vue cognitif constitueraient des facteurs protecteurs face à la maladie (Fratiglioni, Paillard-borg and Winblad 2004).

C. Physiopathologie de la maladie

1. Stades cliniques

La maladie d'Alzheimer se caractérise dans les stades avancés par une forte atrophie cérébrale, notamment au niveau du cortex et de l'hippocampe, deux structures clés dans les fonctions mnésiques et cognitives. Cette atrophie est due à une importante mort neuronale dans ces

régions et s'accompagne d'une dilation des ventricules cérébraux (**Figure 3**). Au niveau de l'hippocampe, on a ainsi pu observer une perte de volume de 4 à 6 % par an au cours des stades cliniques (Jack *et al.* 2009). De plus, depuis les premières observations faites par Alois Alzheimer, les principales caractéristiques de ces stades avancés sont la présence de deux types de lésions : les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques amyloïdes. L'observation de ces différentes caractéristiques en *post-mortem* constitue toujours, à l'heure actuelle, le seul diagnostic certain de la pathologie (Ballard *et al.* 2011).

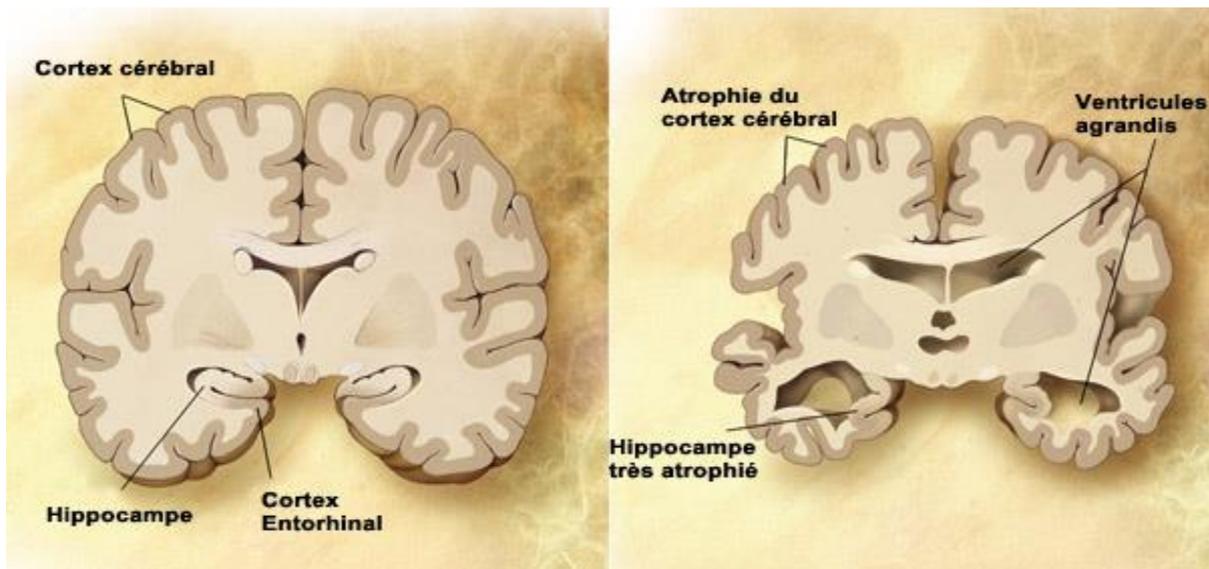


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau sain (à gauche) et de l'atrophie massive d'un cerveau à un stade avancé d'Alzheimer (à droite). (Source : lecerveau.mcgill.ca)

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont constitués d'agrégats de la protéine tau. Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des *microtubules associated proteins* (MAP) qui a pour rôle de stabiliser la tubuline pendant la polymérisation des microtubules. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, tau est phosphorylée de manière anormale, entraînant ainsi son détachement des microtubules (Grundke-iqbal *et al.* 1986). La forme hyperphosphorylée de tau est moins soluble que la forme non phosphorylée, ce qui conduit à son agrégation dans les neurones. Cet événement, qui semble survenir en premier lieu dans les axones, perturbe la dynamique du cytosquelette et par conséquent le transport axonal nécessaire au bon fonctionnement du neurone, ce qui à terme participe à la mort neuronale (Sarkar 2018). Comme mentionné précédemment, l'hyperphosphorylation de tau semble être un événement subséquent à la surproduction d'A β dans la maladie d'Alzheimer. Même si les mécanismes exacts permettant de faire le lien entre A β et phosphorylation de tau sont encore mal connus, il semblerait que cela passe par un gain d'activité de certaines kinases (Ferrer *et al.* 2005). Ce gain d'activité concernerait entre autres la Ca²⁺/calmoduline protéine kinase II (CAMKII).

L'activité de cette kinase étant dépendante du calcium, cela pourrait faire le lien avec la perturbation de la signalisation calcique intracellulaire induite par A β dont nous parlerons plus tard.

Les plaques séniles sont, quant à elles, des agrégats extracellulaires insolubles majoritairement constituées du peptide β -amyloïde. Ce peptide provient du clivage de la protéine membranaire APP. Ce clivage se produit selon deux voies, dites amyloïdogéniques ou non-amyloïdogéniques, selon si elles conduisent à la formation du peptide A β ou non (**Figure 4**). Au sein de la voie non amyloïdogénique, APP est clivée par l' α -sécrétase dans la région C-terminale, produisant un fragment de 83 acides aminés (C83) et le fragment sAPP α qui sera sécrété dans le milieu extracellulaire. La voie amyloïdogénique est médiée par la β -sécrétase qui clive en position C-terminale au niveau de l'acide aminé 99. Ce premier clivage produit le fragment sAPP β sécrété dans le milieu extracellulaire. Puis la γ -sécrétase clivera le fragment C99, libérant ainsi A β et le fragment AICD (*APP intracellular domain*).

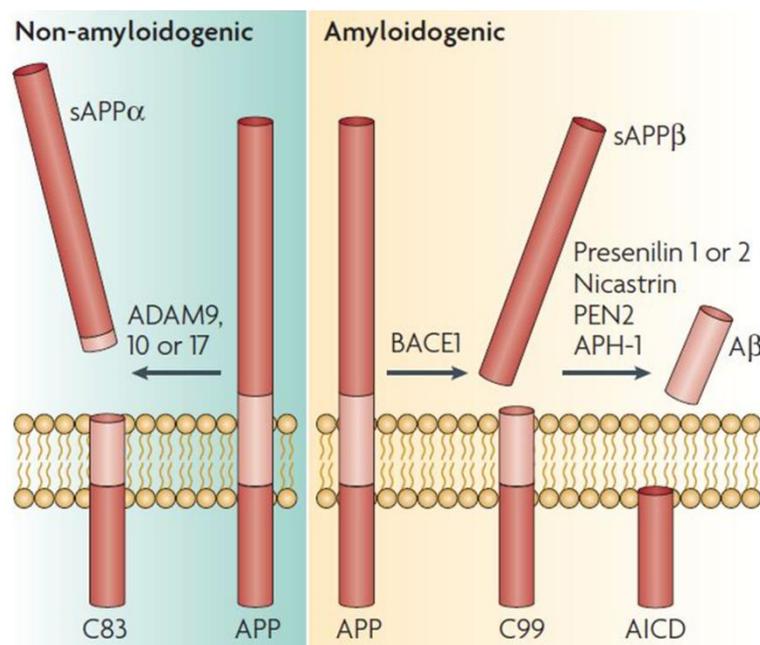


Figure 4 : Voies de protéolyse d'APP. Le peptide amyloïde beta provient du clivage de la protéine APP. APP peut être engagée dans deux voies protéolytiques différentes, non amyloïdogénique (à gauche) et amyloïdogénique (à droite). Le clivage par l' α -sécrétase est réalisé par les enzymes de la famille ADAM. Ce clivage est réalisé à l'intérieur du domaine amyloïde, empêchant donc la production d'A β . Deux fragments sont générés, sAPP α et C83. Pour la voie amyloïdogénique la β -sécrétase (enzyme BACE1) produit deux fragments sAPP β et C99. Le fragment C99 sera ensuite clivé par le complexe enzymatique de la γ -sécrétase, formé entre autres par PS1 ou PS2, pour libérer le peptide A β . (Adapté de LaFerla *et al.* 2007).

Le peptide A β est produit sous forme de monomère. Sa forte hydrophobicité l'amène à s'agréger rapidement pour former des oligomères de faible poids moléculaire dans un premier temps, correspondant à des dimères ou trimères principalement. Par la suite ces espèces se regroupent pour former des oligomères de haut poids moléculaires jusqu'à former des fibrilles insolubles. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, c'est l'agrégation des formes fibrillaires qui est à l'origine des plaques amyloïdes (Walsh and Selkoe 2007). En temps normal, le clivage amyloïdogénique d'APP produit majoritairement un peptide A β de 40 acides aminés (A β ₁₋₄₀). Mais les travaux de Iwatsubo *et al.* en 1994 ont permis de mettre en évidence que dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les plaques sont majoritairement formées d'A β ₁₋₄₂. La présence de deux acides aminés hydrophobes supplémentaires (Alanine et Isoleucine) en position C-terminale augmente la capacité de cette isoforme à s'agréger (Sgourakis *et al.* 2007). La toxicité d'A β semble être liée à cette propriété d'agrégation.

Outre ces deux lésions caractéristiques, les stades avancés de la pathologie se caractérisent également par des signes d'inflammation, avec notamment une activation microgliale, une astrogliose et une dystrophie des neurites à proximité des plaques (pour revue voir Bolós, Perea and Avila 2017).

Dans un premier temps, la communauté scientifique s'est donc intéressée aux plaques en tant qu'élément central de la maladie d'Alzheimer. Mais rapidement, plusieurs observations sont venues contredire cette hypothèse. La première étant que des plaques séniles ont été observées dans le cerveau de personnes qui font l'objet d'un vieillissement sans problèmes cognitifs (Dickson *et al.* 1991). De plus, il y a une très faible corrélation entre les plaques séniles et la mort neuronale (Benilova, Karran and De Strooper 2012). Puis les avancés dans les tests de dosage des formes solubles d'A β , notamment par *ELISA* et *western-blot*, sur des échantillons obtenus *post-mortem* ont permis de montrer qu'une augmentation de la quantité de formes solubles du peptide corrèle mieux avec les déficits cognitifs de la maladie que le nombre de plaques (McLean *et al.* 1999; Wang *et al.* 1999). Enfin, les travaux de Tomiyama *et al.* 2008 ont permis de mettre en évidence un nouveau mutant d'APP dans une forme familiale au Japon. Cette mutation appelée *Osaka* accélère l'oligomérisation d'A β mais ne permet pas la formation de fibrilles et donc de plaques amyloïdes. Pour autant, les personnes porteuses de cette mutation présentent des troubles cognitifs de grande ampleur avec une survenue des symptômes de manière extrêmement précoce (Tomiyama and Shimada 2020). Ces observations semblent donc indiquer que les éléments pathogènes liés à la maladie d'Alzheimer sont les formes solubles du peptide A β plutôt que les plaques séniles. Une des hypothèses désigne par ailleurs la formation

des plaques amyloïdes comme un mécanisme de séquestration qui permet d'atténuer la toxicité du peptide (Reiss *et al.* 2018).

Une étude menée sur des patients atteints de formes familiales de la maladie, a montré des changements du niveau d'A β ₁₋₄₂ dans le liquide cérébro-spinal (LCS) 25 ans avant l'apparition des symptômes. Les plaques amyloïdes, quant à elles, commencent à être détectées environ 15 ans avant les symptômes (Bateman *et al.* 2012). D'autre part dans le cas des formes sporadiques, une étude rétrospective sur des patients présentant des troubles cognitifs légers ou MCI (*mild cognitive impairments*) et qui ont évolué vers la maladie d'Alzheimer par la suite, a également permis de montrer une modification du niveau d'A β ₁₋₄₂ dans le LCS 5 à 10 ans en amont des premiers symptômes (Buchhave *et al.* 2012). Cela suggère donc un rôle très précoce des formes solubles d'A β dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer.

2. Stades précliniques

a. Signes annonciateurs de la maladie

Les stades précoces de la maladie d'Alzheimer chez l'homme sont difficilement étudiables de par leur caractère asymptomatique. C'est pourquoi la majorité des données dont nous disposons actuellement relèvent d'études longitudinales sur des patients présentant des MCI. Le terme MCI a été introduit pour faire référence à des personnes présentant des performances cognitives déficitaires par rapport aux performances considérées comme physiologiquement « normales » pour des personnes du même âge. Pour autant, ces performances ne sont pas suffisamment altérées pour être considérées comme pathologiques ou démentielles. Dans certains cas ces MCI n'évolueront pas ou de manière limitée, mais dans d'autres cas elles pourront être annonciatrices de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, l'évolution de ces patients vers un état plus avancé de la maladie et la confirmation du diagnostic en *post-mortem* permettront une analyse rétrospective des résultats pour comprendre davantage les stades précoces de cette maladie.

Outre les variations du niveau d'A β dans le LCS mises en évidence par les études mentionnées ci-dessus, il apparaît également d'autres caractéristiques de ces stades précoces. En effet, l'analyse par microscopie électronique de tissus obtenus quelques heures après autopsie *post-mortem* a permis de détecter qu'une altération de la densité synaptique dans l'hippocampe était observable chez les personnes présentant des MCI (Scheff *et al.* 2006). Plus particulièrement, cette baisse est estimée à 18 % au niveau de CA1, dans la région du *stratum radiatum*, par rapport à des échantillons provenant de personnes du même âge n'ayant pas d'atteintes cognitives (Scheff, Price and Dekosky 2007). Cette perte synaptique au sein de l'hippocampe

a récemment été confirmée *in vivo* par imagerie *PET-scan* toujours sur un groupe de patients atteints de MCI (Bastin *et al.* 2019). Les patients MCI présentent également une connectivité fonctionnelle de l'hippocampe vers les lobes préfrontaux, pariétaux temporaux ainsi que le cervelet qui apparaît significativement plus faible que les sujets contrôles. Ces résultats ont été obtenus par imagerie à résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) lors d'exercices impliquant la mémoire épisodique, qui constitue le type de mémoire atteinte en premier lieu dans le développement de la maladie (Bai *et al.* 2009).

Cependant, alors que l'IRMf a mis en évidence une hypoactivité cérébrale dans les stades avancés, les stades précoces semblent paradoxalement marqués par une hyperactivité, notamment au niveau de l'hippocampe (**Figure 5**) (Dickerson *et al.* 2005; Miller *et al.* 2008; O'Brien *et al.* 2010; Sperling 2011). Dans un premier temps, la communauté scientifique a imaginé que cette hyperactivité traduisait un mécanisme compensatoire mais il s'avère qu'elle est directement corrélée à la diminution des performances cognitives. Cette hyperactivité hippocampale semble contribuer de manière importante aux troubles mnésiques associés aux MCI et constitue un facteur de risque pour l'évolution ultérieure de ces patients vers la maladie d'Alzheimer (Haberman, Branch and Gallagher 2017). Dans une étude sur un groupe de personnes présentant des MCI de type amnésique (aMCI), Bakker *et al.* 2012 ont montré que l'administration d'un antiépileptique (levetiracetam) à faible dose permettait de ramener l'hyperactivité hippocampique observée à un niveau comparable aux sujets contrôles et que cela se traduisait par une amélioration des performances cognitives. Les mécanismes d'action de cet antiépileptique de nouvelle génération sont encore mal connus mais il est intéressant de noter qu'une des hypothèses du fonctionnement de ce composé propose le blocage de la libération de glutamate par les astrocytes (Sanz-blasco *et al.* 2016). Indirectement, cela suggère

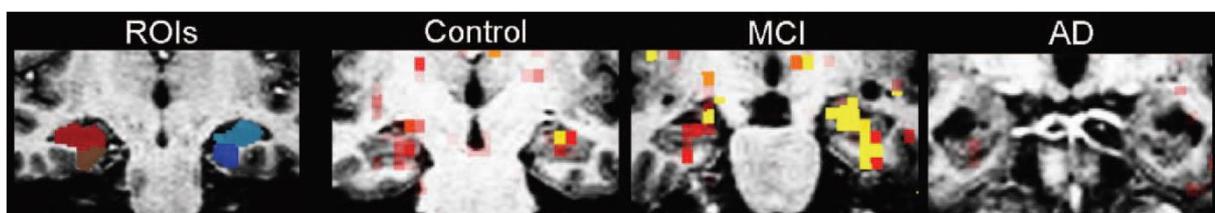


Figure 5 : Vues coronales représentatives de données IRM fonctionnelle provenant de sujets uniques. Régions d'intérêt (ROI) : exemples de ROIs anatomiques pour la région de l'hippocampe (rouge et bleu clair) et du cortex entorhinal (marron et bleu foncé), délimité manuellement sur des scans IRM structurels haute résolution. Ces résultats ont été obtenus au cours de la réalisation d'une tâche de reconnaissance de visages avec mémorisation des noms. Contrôle (Control), troubles cognitifs légers (MCI), Maladie d'Alzheimer (AD) : exemples de cartes d'activation en IRM fonctionnelle d'un sujet de chaque groupe superposée au balayage structurel pondéré de ce sujet. (Adapté de Dickerson *et al.* 2005).

donc un rôle astrocytaire dans cette hyperactivité. Nous reviendrons sur ce point dans la deuxième partie de cette introduction.

Malgré le caractère asymptomatique de ces stades précoces, cette hyperactivité pourrait jouer un rôle pathologique, notamment en donnant lieu à des crises épileptiques subcliniques, délétères sur le plan cognitif (Vossel *et al.* 2016). Il a d'ailleurs été décrit l'existence d'un risque accru de développer une ou des crises d'épilepsie chez les patients Alzheimer. En effet, suivant les études, jusqu'à 64 % des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont fait ou font régulièrement l'objet de crises d'épilepsie non provoquées. La survenue de ces activités épileptiformes semble être associée à des formes plus sévères de la maladie, avec un développement plus rapide, des troubles cognitifs plus importants et une perte neuronale plus grande observée lors de l'autopsie (Vossel *et al.* 2017).

Par ailleurs, il nous paraît intéressant de mentionner ici une étude réalisée sur deux patientes dont le dosage d'A β et de tau dans le LCS ont permis de proposer le diagnostic de la maladie d'Alzheimer. Ces patientes ont été implantées avec des électrodes au niveau du lobe temporal mésial de l'hippocampe permettant de mesurer l'activité de cette région (Lam *et al.* 2017). La première, présentait des MCI de type amnésique et les électrodes implantées ont permis de mettre en évidence des activités épileptiformes importantes (environ 400 pics/h pendant l'état de veille et 850 pics/h pendant le sommeil). La deuxième, présentait des formes de démences sévères et les enregistrements ont révélé de moindres activités épileptiformes (environ 16 pics/h pendant l'état de veille et 190 pics pendant le sommeil). Dans les deux cas, ces activités épileptiformes sont silencieuses sur le plan clinique et semblent être limitées à la région d'implantation des électrodes. Même s'il ne s'agit que de deux cas cliniques qui représentent deux états d'avancement de la pathologie, ces résultats semblent tendre en faveur d'une hyperactivité précoce au sein de l'hippocampe, impliquée dans la pathogénèse de la maladie. Il est intéressant de noter que cette hyperactivité apparaît plus importante pendant le sommeil, ce qui pourrait interférer avec les mécanismes de consolidation de la mémoire (Stickgold 2005).

En résumé, depuis le début des années 90 et l'émergence de l'hypothèse amyloïde, le peptide A β est désigné comme élément déclencheur de la maladie d'Alzheimer. Plus exactement, c'est son accumulation qui est suspectée être responsable d'une cascade d'évènements conduisant au phénotype pathologique (**Figure 6**). Nous avons vu que ce sont les formes solubles d'A β qui sont corrélées à la progression de la maladie indépendamment des plaques amyloïdes. De manière intéressante, une modification de la quantité de ces formes solubles a été mise en évidence bien en amont de l'apparition des premiers symptômes. Nous avons vu que ces stades

précliniques sont associés à une hyperactivité, mise en évidence notamment au niveau de l'hippocampe et qui apparaît comme l'un des premiers éléments de la maladie. Cette hyperactivité participerait ainsi à la phase cellulaire de la maladie décrite par De Strooper and Karran en 2016. Il est important de comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette phase cellulaire, en lien avec l'hyperactivité, et qui pourraient expliquer le basculement vers la phase clinique. Pour cela, il paraît intéressant de se pencher sur le concept d'excitotoxicité.

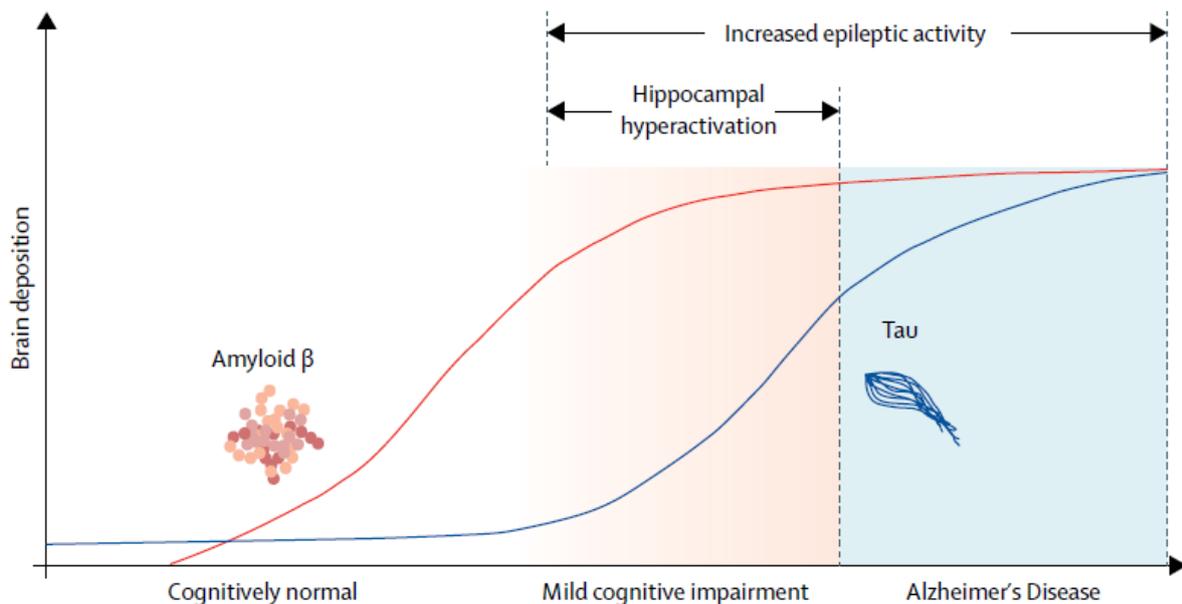


Figure 6 : Modèle hypothétique de la corrélation entre l'accumulation d'A β , l'accumulation de tau, les perturbations d'activité neuronale et la maladie d'Alzheimer. Associations temporelles proposées entre la quantité d'A β totale et la quantité de tau phosphorylée dans le cerveau, l'hyperactivation de l'hippocampe et l'activité épileptique. Bien que l'hyperactivation de l'hippocampe soit limitée au stade de la déficience cognitive légère, l'activité épileptiforme et les crises peuvent se produire tout au long de l'évolution des troubles cognitifs légers et de la maladie d'Alzheimer. (Adapté de Vossel *et al.* 2017).

b. Excitotoxicité

Le glutamate est un acide aminé considéré comme le principal neurotransmetteur exciteur endogène du cerveau chez les mammifères (Fagg and Foster 1983). Différentes observations ont montré que cet acide aminé pouvait également avoir un rôle toxique pour les neurones dans certains cas. Tout d'abord en 1954, il a été montré que l'injection d'une solution de glutamate directement dans le cortex de chiens, singes et humains induisait des crises d'épilepsie accompagnées de convulsions. Ceci témoigne ainsi du fort potentiel activateur du glutamate sur l'activité neuronale (Hayashi 1954). Puis en 1957, l'observation de la destruction des neurones de la rétine chez des souris nourries avec de la nourriture contenant du glutamate a permis

de mettre en lumière la toxicité de cette substance (Lucas and Newhouse 1957). Par la suite, des injections sous-cutanées de glutamate ont montré plusieurs effets délétères dont d'importantes nécroses dans différentes régions du cerveau (Olney 1969). Par ailleurs, J.W. Olney a montré que l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs au glutamate permet un blocage efficace des effets neurotoxiques du glutamate ou de ses analogues, mettant ainsi en lumière le rôle important des récepteurs au glutamate dans la mort neuronale (Olney 1971). Il fit donc l'hypothèse que le mécanisme mis en jeu dans ce processus toxique était semblable à celui de l'excitation glutamatergique et fonda le concept d'excitotoxicité.

In vivo, le glutamate extracellulaire est très finement régulé, à la fois en terme de concentration et de localisation. En condition basale, on estime que la concentration au niveau de la fente synaptique est d'environ 0,6 μM . Lors de la transmission synaptique cette concentration va augmenter très brièvement (1-2 ms) et de manière très localisée atteindre 1 mM (Clements *et al.* 1992). Le retour de la concentration de glutamate à un niveau basal met en jeu un système de recapture de haute affinité impliquant des transporteurs sur la membrane neuronale pré-synaptique, mais surtout sur la membrane astrocytaire avoisinant la synapse (**Figure 7**) (pour revue voir Hynd, Scott and Dodd 2004). Nous reviendrons sur ce point dans la partie sur la synapse tripartite.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il a été noté une mort neuronale très précoce au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe. Cette mort cellulaire s'accroît avec le développement de la pathologie jusqu'à atteindre 35 % pour le cortex entorhinal et 46 % pour la région CA1 de l'hippocampe, dans les stades intermédiaires de développement de la maladie (Price *et al.* 2001). Or, ces deux structures sont interconnectées via des voies excitatrices glutamatergiques, ce qui semble confirmer l'hypothèse d'une perturbation de la transmission excitatrice dans la pathogénèse. Cependant, comme nous l'avons dit plus haut, les stades précoces sont difficilement étudiables de par leur caractère asymptomatique. Les données témoignant d'un processus excitotoxique chez l'homme sont donc peu nombreuses. Ceci justifie en partie la nécessité d'avoir recours à des modèles animaux afin de mieux comprendre la genèse de la maladie. Nous verrons cela plus en détails dans la partie sur les modèles murins de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, il a quand même été rapporté chez l'homme plusieurs éléments attestant d'une perturbation de l'homéostasie glutamatergique. Notamment, il a été rapporté une altération de la glutamine synthétase (enzyme impliquée dans le recyclage du glutamate, présente dans le cytosol des prolongements astrocytaires péri-synaptiques), avec une

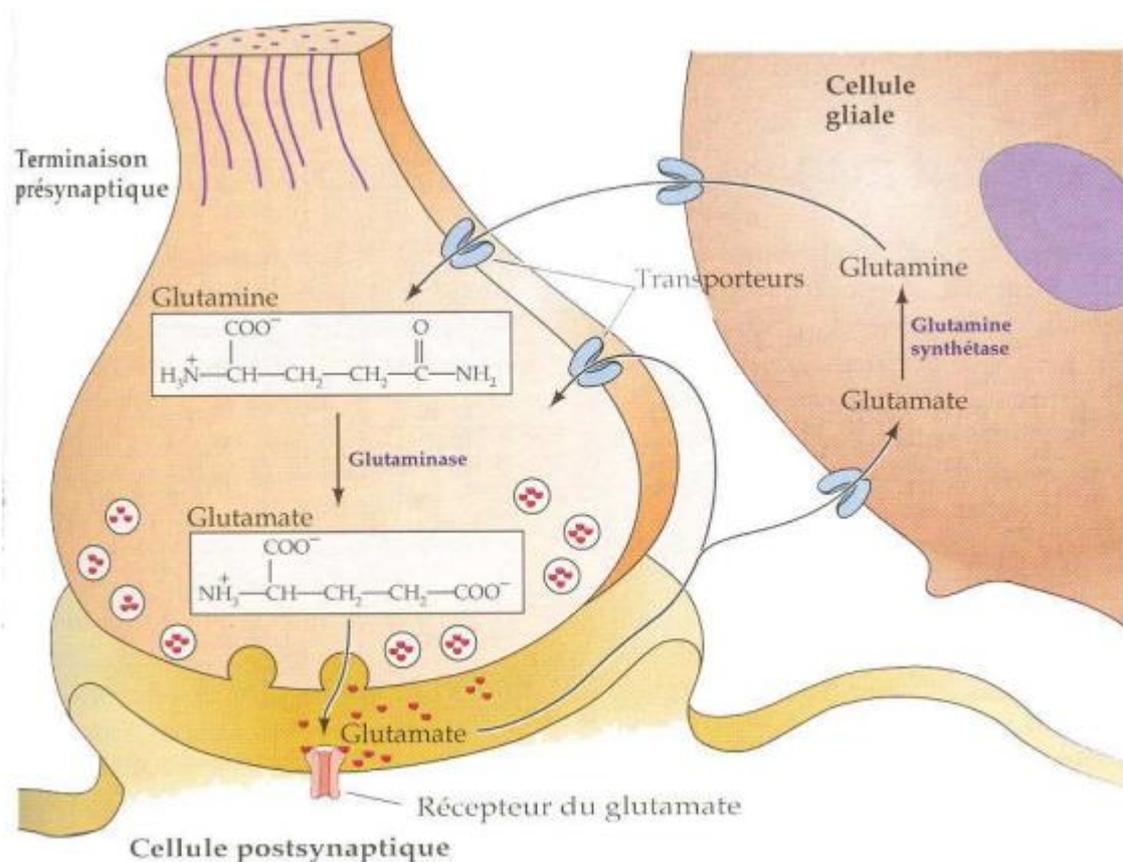


Figure 7 : Synthèse du glutamate et cycle de transfert entre les neurones et les cellules gliales. L'action du glutamate libéré dans la fente synaptique prend fin avec sa recapture par les neurones et par les cellules gliales environnantes (astrocytes) au moyen de transporteurs spécifiques. A l'intérieur de la terminaison axonale, la glutamine libérée par les cellules gliales est de nouveau convertie en glutamate. Le glutamate est transporté dans les cellules par les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT pour *Excitatory Amino Acid Transporters*) et chargé dans les vésicules par les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT pour *Vesicular Glutamate Transporters*). (Adapté de Neurosciences 4^{ème} édition, Purves *et al.* 2012).

augmentation de son oxydation notée dans le cerveau *post-mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Butterfield *et al.* 1997; Castegna *et al.* 2002). Toujours sur des échantillons obtenus en *post-mortem*, il a été noté une diminution de l'activité des transporteurs du glutamate chez des patients Alzheimer (Masliah *et al.* 1996) et notamment la diminution de l'un d'entre eux, GLT-1 pour *Glutamate Transporter 1*, également nommé EAAT2 pour *Excitatory Amino Acid Transporter 2* (Hoshi *et al.* 2018). Là encore, ces observations mettent en lumière l'astrocyte puisque les transporteurs du glutamate sont présents en majorité sur la membrane astrocytaire à proximité de la synapse pour permettre la recapture du glutamate. Par ailleurs, une étude japonaise a comparé des cerveaux de différentes personnes en distinguant trois groupes : 1) les cerveaux présentant les caractéristiques anatomiques de la maladie d'Alzheimer appartenant à des personnes qui présentaient des démences de leur vivant, 2) les

cerveaux présentant les caractéristiques de la maladie appartenant à des personnes qui ne présentaient pas d'atteintes cognitives anormales et 3) les cerveaux de sujet sains. Au travers de cette étude, ils ont montré que les cerveaux de type Alzheimer appartenant à des personnes sans atteintes cognitives présentaient un niveau d'expression de GLT-1 supérieur à celui observé dans les cerveaux de type Alzheimer appartenant aux personnes atteintes de troubles cognitifs (Kobayashi *et al.* 2018). Toutes ces observations suggèrent donc que des défauts de régulation de la recapture et du recyclage du glutamate sont associés aux troubles cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer.

De manière générale, il apparaît que la neurotoxicité du glutamate tient à l'augmentation anormale de sa disponibilité dans le compartiment extracellulaire en termes de concentration, de localisation et de durée. Ainsi, dans un contexte pathologique, cette toxicité pourra être déclenchée par un défaut dans le système de recapture ou par une libération excessive conduisant à une dérégulation de l'homéostasie glutamatergique. Cela aurait ainsi pour conséquence une forte activation des récepteurs au glutamate, conduisant à une importante augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, ce qui nous amène à l'hypothèse calcique pouvant expliquer la neurotoxicité dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

c. Implication des récepteurs NMDA

Différentes études ont montré que la neurotoxicité induite par le glutamate était dépendante du calcium (pour revue voir Choi 1992). Comme mentionné ci-dessus, l'excitotoxicité du glutamate passe par une sur-activation de ses récepteurs. Ces récepteurs sont classés en deux catégories, les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (iGluR) (**Figure 8**). Les premiers sont nommés ainsi car il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G, dont la mise en jeu va avoir pour conséquence l'activation de différents effecteurs intracellulaires. Dans le cas des mGluR appartenant au groupe I (mGluR1 et mGluR5), l'effecteur mis en jeu est la phospholipase C qui va permettre l'augmentation de la concentration intracellulaire de l'inositol triphosphate (IP₃). L'IP₃ en se fixant sur des récepteurs présents à la surface du réticulum endoplasmique permet une libération massive de calcium, augmentant ainsi sa concentration cytosolique. Cependant, il a été montré que la déplétion en calcium du milieu extracellulaire sur des neurones en culture permet de bloquer les dégâts induits par l'application de glutamate sur ces neurones (Choi 1985). Ces expériences montrent que la neurotoxicité induite par le glutamate passe en premier lieu par une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire. Ceci nous amène donc à considérer en premier lieu

les iGluR dans la toxicité glutamatergique, puisqu'il s'agit de récepteurs canaux directement impliqués dans des influx ioniques.

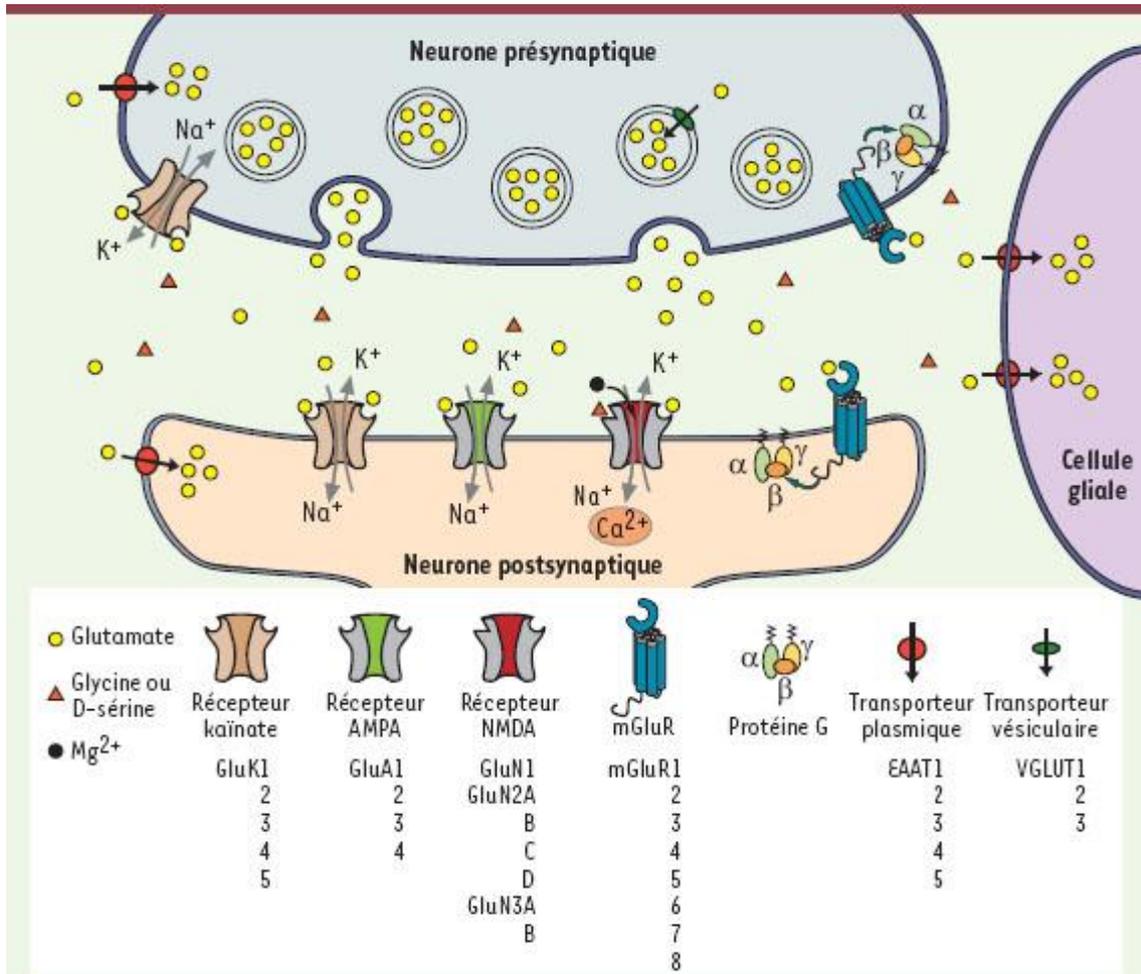


Figure 8 : Récepteurs du glutamate. Les récepteurs du glutamate au niveau de la synapse excitatrice sont divisés en deux catégories : les récepteurs métabotropiques (mGluR), qui sont des récepteurs couplés aux protéines G permettant l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire ; les récepteurs ionotropiques (iGluR), parmi lesquels on retrouve les récepteurs au kainate, les récepteurs AMPA et les récepteurs NMDA. Les iGluR sont des récepteurs canaux perméables à différents cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), permettant la dépolarisation du neurone post-synaptique et donc la transmission excitatrice entre neurones. (Adapté de Gielen 2010).

Les iGluR sont composés de trois sous-types nommés en fonction de leur agoniste de prédilection : N-méthyl-D-aspartate (NMDA), kainate, et alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA). L'activation de ces récepteurs en présence de glutamate va entraîner une modification de leur structure, et notamment entraîner l'ouverture d'un canal perméable à différents ions (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}). Cela permet ainsi la dépolarisation de la membrane et donc la transmission excitatrice rapide au sein du cerveau. Plusieurs expériences, avec différents outils pharmacologiques impactant ces récepteurs, ont rapidement permis de

montrer que la mise en jeu du récepteur NMDA (NMDAR) était nécessaire et suffisante pour permettre l'excitotoxicité (pour revue voir Choi 1992).

Les récepteurs NMDA sont organisés en hétéro-tétramères dont il existe sept sous-unités possibles : NR1, NR2 (A, B, C ou D) et NR3 (A ou B). La structure la plus courante associe deux sous-unités NR1 permettant la fixation d'un co-agoniste (glycine ou D-sérine), à deux sous-unités NR2 permettant la fixation du glutamate. La particularité de ces récepteurs est de nécessiter une dépolarisation membranaire suffisante pour lever le blocage du pore par l'ion Mg^{2+} et obtenir l'ouverture du canal (**Figure 9**) (Gielen 2010). C'est pour cela qu'en conditions physiologiques, l'activation de ces récepteurs nécessite la présence de récepteurs AMPA (AMPA) à proximité. Les synapses ne contenant que des récepteurs NMDA sont décrites

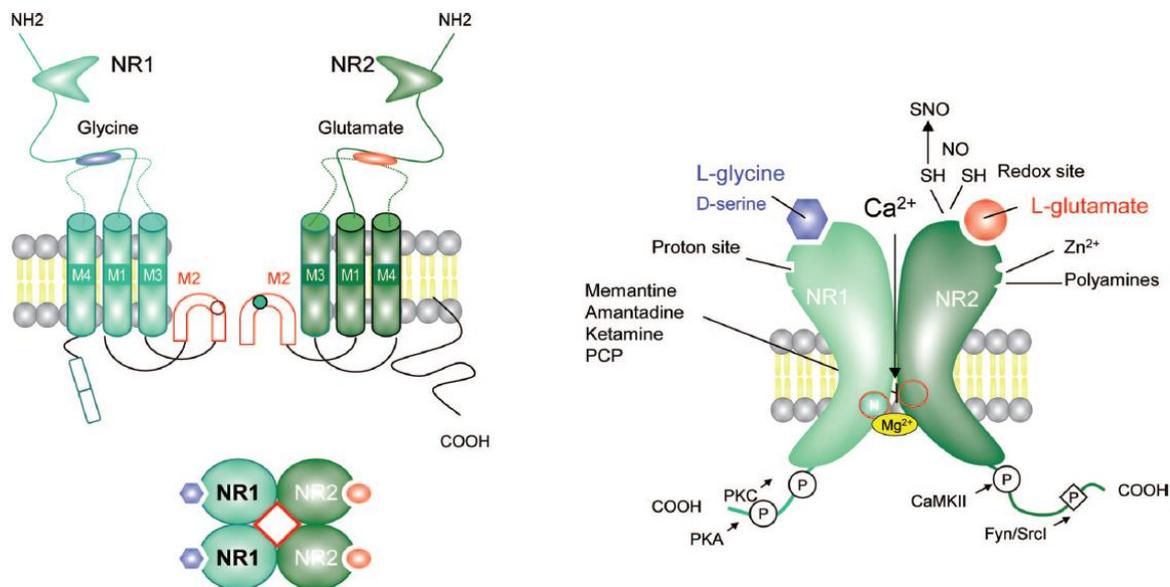


Figure 9 : Structure du récepteur NMDA (NMDAR). Les NMDAR sont des hétéro-tétramères composés de 4 sous-unités issues de 3 familles apparentées : NR1, NR2, et NR3 ; le NR1 est une sous-unité obligatoire dans la structure du récepteur qui se combine avec les sous-unités NR2 ou NR3 pour former un récepteur fonctionnel. Le NMDAR le plus répandu nécessite deux sous-unités NR1, qui lient la glycine (ou D-sérine), et deux sous-unités NR2 qui lient le glutamate. Chaque sous-unité NMDAR contient un grand domaine N-terminal extracellulaire, 3 domaines membranaires (M1, M3, M4), une boucle de rentrée ou boucle en épingle à cheveux, qui forme la région du revêtement des pores (M2), et un domaine C-terminal qui possède un site de phosphorylation (P). Les récepteurs NR1/NR2 sont perméables au Ca^{2+} et leur activation nécessite la liaison de 2 molécules de glutamate à la sous-unité NR2 et de 2 molécules de glycine (ou D-sérine) à la sous-unité NR1. L'ouverture du canal est dépendante du voltage, imposé par un ion Mg^{2+} . Il existe plusieurs sites modulateurs qui affectent le fonctionnement des NMDAR. Ceux-ci incluent un site pour les polyamines, un site pour le Zn^{2+} , un site sensible aux protons et un site modulateur d'oxydoréduction. (Adapté de Benarroch 2011).

comme silencieuses. D'ailleurs, le recrutement de récepteurs AMPA au niveau de ces synapses silencieuses fait partie des mécanismes de potentialisation de l'activité synaptique (Kerchner and Nicoll 2008). La plasticité synaptique en lien avec ces mécanismes sera abordée plus loin.

Par opposition à leur rôle délétère établi dans les processus excitotoxiques, les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans un grand nombre de processus essentiels pour le développement et le fonctionnement neuronal. Parmi ces processus, on retrouve notamment la plasticité synaptique (Lau *et al.* 2009). La plasticité synaptique correspond aux mécanismes moléculaires mis en place au sein de la synapse pour permettre de renforcer l'efficacité de la transmission ou de la déprimer. On parle alors respectivement de potentialisation ou facilitation et de dépression. La potentialisation et la dépression synaptique sont ainsi deux mécanismes dynamiques qui fonctionnent de manière complémentaire et l'équilibre entre ces deux processus est à la base d'un fonctionnement sain des neurones. Ces mécanismes sont considérés comme étant le corrélat moléculaire de la mémoire et de l'apprentissage. Pour les étudier l'approche privilégiée repose sur différents protocoles électrophysiologiques. En effet, la transmission synaptique repose sur la dépolarisation membranaire de l'élément post-synaptique à la suite de la fixation de transmetteurs sur des récepteurs. Cette dépolarisation correspond à des mouvements d'ions à travers la membrane qui peuvent être suivi électriquement. Parmi les mécanismes de plasticité, on distingue la plasticité pré-synaptique et la plasticité post-synaptique. Nous reviendrons plus tard sur la plasticité pré-synaptique. Dans le cas de la plasticité post-synaptique, elle repose sur la capacité à moduler la réponse en modifiant la quantité de récepteurs pouvant être sollicités par les neurotransmetteurs libérés. Le recrutement ou l'internalisation de récepteurs correspondant à une modification plus durable de la synapse, on parle alors de plasticité à long terme. Il a ainsi été mis en évidence, qu'une stimulation électrique à fréquence élevée permettait une potentialisation à long terme de la réponse synaptique (*Long Term Potentiation* – LTP). A l'inverse, une stimulation basse fréquence semble induire une dépression à long terme (*Long Term Depression* – LTD). Il est aujourd'hui admis que les mécanismes qui sous-tendent cette plasticité sont majoritairement dépendants des récepteurs NMDA (Citri and Malenka 2008). Cela fait des NMDAR un candidat tout à fait pertinent à étudier dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Cette ambivalence fonctionnelle des récepteurs NMDA pose néanmoins quelques interrogations. En effet, comment cela se fait-il qu'un même récepteur impliqué dans la transmission excitatrice puisse jouer un rôle à la fois dans des processus bénéfiques comme la plasticité synaptique et dans des processus délétères pour la survie cellulaire comme l'excitotoxicité ?

Cette question nous amène donc à considérer la localisation de ces récepteurs, la variabilité de leur composition en sous-unités, mais également la signalisation calcique intracellulaire sous-jacente. En effet, les NMDAR sont les seuls parmi les récepteurs ionotropiques du glutamate à présenter une forte perméabilité au calcium dans un cerveau adulte (MacDermott *et al.* 1986). La littérature sur la régulation et l'implication des NMDAR dans diverses voies de signalisation est extrêmement vaste. Cependant, nous pouvons en résumer une partie en distinguant deux types de NMDAR. En effet, il existe une hypothèse mettant en opposition les récepteurs NMDA se trouvant au niveau de la fente synaptique, composés principalement de sous-unités NR1/NR2A, et les récepteurs NMDA péri-synaptiques ou extra-synaptiques, composés plutôt de sous-unités NR1/NR2B (**Figure 10**) (Benarroch 2011). Dans le cas d'une localisation synaptique, l'influx de calcium à travers les NMDAR va permettre l'activation de diverses kinases. Ces kinases vont permettre dans un premier temps la phosphorylation et le recrutement de récepteurs AMPA et NMDA au niveau de synapses, permettant la potentialisation de la réponse synaptique. Dans un second temps, elles participent à des voies de signalisation permettant la synthèse de molécules impliquées dans le maintien de la potentialisation et plus généralement dans la survie cellulaire (Benarroch 2011).

A l'inverse, l'influx de calcium à travers les récepteurs NMDA extra-synaptiques semble être associé à un gain d'activité de phosphatases dont le rôle va s'opposer à celui des kinases et plus généralement déclencher des voies de signalisation impliquées dans la perte synaptique et dans des processus excitotoxiques et pro-apoptotiques (Sattler *et al.* 2000; Hardingham *et al.* 2002; Léveillé *et al.* 2008). Il apparaît ainsi tout à fait logique que le glutamate fasse l'objet d'une régulation fine au niveau de la synapse en condition physiologique. De la même manière, on comprend bien qu'une application exogène de glutamate sur des neurones ou une mauvaise régulation de ce dernier dans un contexte pathologique puisse conduire à l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il existe peu de données dans la littérature qui rapportent une modification des propriétés intrinsèques des NMDAR chez l'homme. En revanche, une étude réalisée par Mishizen-eberz *et al.* 2004, a permis de montrer que le niveau d'expression des sous-unités NR1 et NR2B ainsi que la quantité d'ARN messagers associés diminuent avec la progression de la maladie, alors que pour la sous-unité NR2A ces paramètres restent inchangés. Or, comme nous l'avons vu, les sous-unités NR1 et NR2B sont les principaux constituants des NMDAR extra-synaptiques qui semblent préférentiellement pro-apoptotiques.

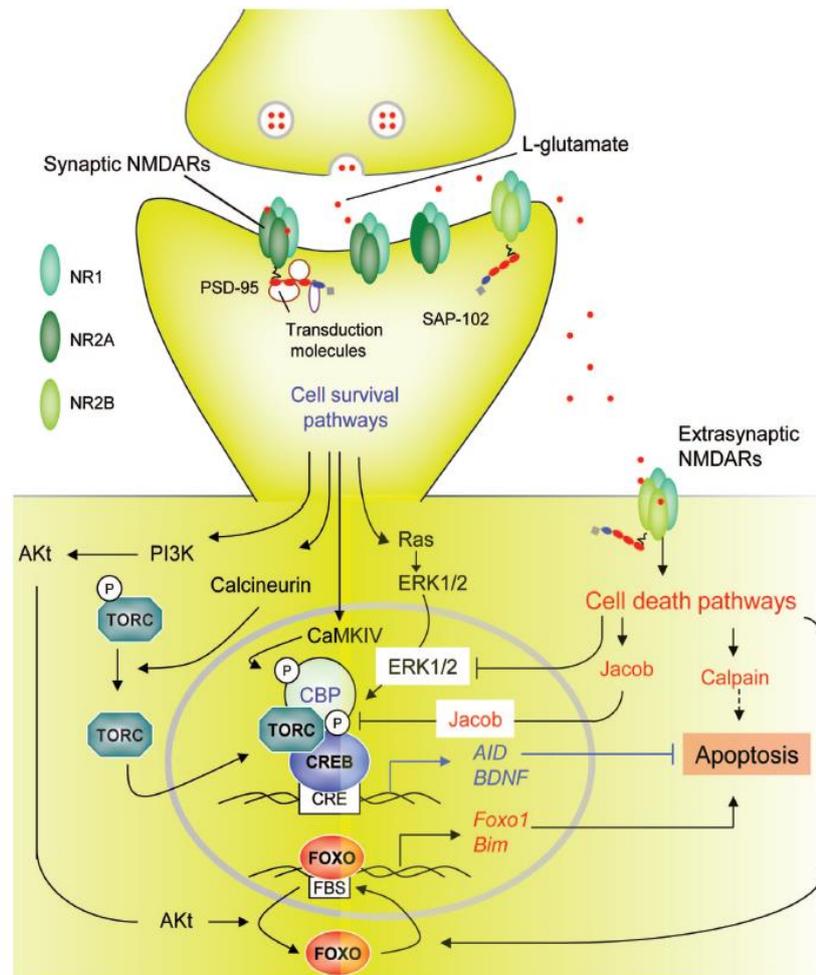


Figure 10 : Voies de transduction impliquées dans la survie ou la mort cellulaire déclenchées par les récepteurs NMDA synaptiques ou extra-synaptiques. Les NMDAR synaptiques, composés principalement de sous-unités NR1/NR2A, déclenchent des voies de transduction neuroprotectrices, alors que les NMDAR extra-synaptiques, composés principalement de sous-unités NR1/NR2B, initient des voies de mort cellulaire. Les NMDAR extra-synaptiques sont présents au niveau de la zone périssynaptique, répartis sur les dendrites et dans certains cas adjacents à des prolongements astrocytaires. La neuroprotection synaptique dépendante des NMDAR implique des cascades de transduction qui provoquent l'induction de gènes de survie, la suppression de gènes de mort ou la protection contre le stress oxydatif. L'influx de calcium via les NMDAR déclenche l'activation de la Ca^{2+} /calmoduline (CaM) kinase IV et de ERK1/2 qui vont permettre la phosphorylation de CREB (*Cyclic-AMP Response Element Binding protein*). CREB favorise la transcription de AID (*Activity-regulated Inhibitors of Death*) et de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), qui fournissent des effets neuroprotecteurs à large spectre. L'activité des NMDAR synaptiques déclenche la suppression transcriptionnelle des composants essentiels de la cascade apoptotique. En revanche, les NMDAR extra-synaptiques déclenchent la mort cellulaire par plusieurs voies de transduction, dont beaucoup sont antagonistes de celles déclenchées par les NMDAR synaptiques. Parmi celles-ci, la déphosphorylation CREB par Jacob, l'inhibition de la voie ERK1/2 et l'activation de la calpaïne. (Adapté de Benarroch 2011).

Ces éléments semblent donc suggérer que les NMDAR extra-synaptiques sont la cible privilégiée de la perturbation de l'homéostasie glutamatergique.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des expériences réalisées sur des neurones de rat en culture surexprimant la protéine tau, ont permis de montrer que la toxicité générée par tau requiert l'activation des NMDAR contenant la sous-unité NR2B. Le calcium entrant par ces récepteurs permet ainsi l'activation de kinases à l'origine de l'hyperphosphorylation de tau (Amadoro *et al.* 2006). Ces expériences confirment la temporalité des événements et le lien de causalité supposé entre l'accumulation d'A β et l'accumulation de tau.

En conclusion, il semblerait que les premiers stades de la maladie d'Alzheimer chez l'homme sont marqués par une hyperactivité neuronale. Plusieurs éléments semblent montrer que cette hyperactivité est due à une perturbation de l'homéostasie glutamatergique. Or, il est connu qu'une mauvaise régulation de la quantité de glutamate extracellulaire est à l'origine de processus excitotoxiques qui vont à terme déclencher la perte de synapses et la mort neuronale. Ces processus passent par une augmentation du calcium intracellulaire *via* une sur-activation des NMDAR extra-synaptiques. La question qui se pose consiste à savoir si le peptide A β joue directement un rôle dans ces différents mécanismes.

D. Rôle du peptide A β

Comme nous l'avons vu précédemment, les deux biomarqueurs principaux associés à la maladie d'Alzheimer sont le peptide A β et la protéine tau. L'hypothèse amyloïde désigne l'accumulation d'A β comme point de départ d'une cascade de processus physiopathologiques, dont la modification de l'activité de certaines kinases qui vont entraîner l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Selkoe and Hardy 2016). Même si à l'heure actuelle les thérapeutiques qui visent directement le peptide A β sont en échec, comme nous le verrons plus loin dans cette introduction, plusieurs éléments soutiennent le rôle central de ce peptide dans la maladie d'Alzheimer (Walsh and Selkoe 2020). Pour rappel, les formes familiales de la maladie impliquent des mutations qui ont pour conséquences l'augmentation de la production d'A β ₁₋₄₂. A l'inverse, une mutation d'APP au niveau de la région N-terminale d'A β présente un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer et le déclin cognitif lié à l'âge (Jonsson *et al.* 2012). Par ailleurs, l'allèle ϵ 4 du gène qui code pour l'APOE, constitue le principal facteur de risque génétique retrouvé dans les formes sporadiques de la maladie et un défaut de clairance d'A β semble être l'explication de cette observation (Yu, Tan and Hardy 2014). Enfin, les modifications de la quantité des formes solubles d'A β dans le LCS bien en amont de

l'apparition des premiers symptômes (Buchhave *et al.* 2012) et le fait que la mutation APP *Osaka* ne produise pas de plaques (Tomiyama and Shimada 2020) nous amènent à considérer le rôle pathogène des formes solubles de ce peptide.

1. Rôle physiologique d'A β

Avant de se plonger dans le rôle toxique du peptide A β , il convient de s'interroger sur son rôle physiologique. Mais l'identification de ce rôle demande de répondre au préalable à la question de la concentration. Comme nous l'avons vu, que ce soit dans les formes familiales ou sporadiques, il semblerait que ce soit l'accumulation du peptide qui conduise à la toxicité observée. De plus, comme l'a dit le médecin suisse Paracelse en 1537 :

« Tout est poison et rien n'est sans poison; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison. »

Il existe donc un seuil de concentration hypothétique en dessous duquel le niveau d'A β présent dans le liquide interstitiel est considéré comme physiologique. Ainsi, grâce à des mesures par microdialyse, il a été estimé que la concentration basale d'A β_{1-42} dans le cerveau de souris *in vivo* se situe dans une gamme de concentrations de l'ordre du picomolaire (Teich, Patel and Arancio 2013). Les travaux publiés par Gulisano *et al.* 2019 se sont basés sur cette information pour évaluer l'effet d'applications exogènes de formes oligomériques solubles d'A β (A β_0) à 200 pM. A cette concentration, ils ont mis en évidence un rôle activateur d'A β_0 vis-à-vis de l'activité synaptique au niveau de l'hippocampe. Ils ont observé entre autres, une augmentation de la fréquence des courants miniatures (mEPSCs), ainsi qu'une augmentation de l'ancrage de vésicules au niveau des terminaisons axonales. Ces observations s'accordent avec les travaux de Abramov *et al.* 2009 qui proposaient déjà un rôle physiologique d'A β en tant qu'activateur de la libération de neurotransmetteur au niveau des synapses. L'utilisation de concentrations picomolaires d'A β_0 a également permis de montrer un rôle de modulation positive de la plasticité synaptique (mise en évidence par des expériences de LTP) ainsi qu'un effet bénéfique sur la fonction mnésique des souris (Puzzo *et al.* 2008; Gulisano *et al.* 2019). Ce même groupe de chercheurs a montré en revanche qu'une concentration de 200 nM d'A β_0 altérait la LTP, soulignant ainsi l'importance de la concentration du peptide dans l'effet induit (Puzzo, Privitera and Palmeri 2012). Ces preuves d'un effet bénéfique d'A β à faible concentration ont été enrichies par des expériences où des siRNA dirigés contre les ARN de l'APP murin ont été injectés dans l'hippocampe pour réaliser un *knock-down* du gène de l'APP et donc réduire le niveau d'A β endogène chez des souris *wild-type* (WT). Ces souris présentaient alors une

altération de la LTP et de la mémoire qui pouvaient être restaurées par application de doses picomolaires d'A β ₁₋₄₂ (Puzzo and Arancio 2013). Il semblerait donc que le rôle physiologique d'A β est de stimuler l'activité synaptique.

Par ailleurs, il a été montré que l'activité synaptique exerçait en retour un effet activateur sur le clivage de la protéine APP et donc sur la production d'A β (Kamenetz *et al.* 2003; Cirrito *et al.* 2005). Il paraît ainsi évident qu'une clairance insuffisante du peptide conduise à une boucle activatrice de la transmission synaptique. Cette boucle pourrait ainsi être responsable de la mise en place d'une hyperactivité neuronale observée à la fois chez l'homme et chez les modèles murins de la maladie dans les stades précoces. Cette spirale hyperactivatrice a récemment été mise en évidence par le laboratoire du professeur Konnerth qui a établi la nécessité d'avoir une activité basale préexistante pour la mise en place d'une hyperactivité neuronale. A l'inverse, les neurones apparaissant comme silencieux ne semblent pas sujets à l'hyperactivité (Zott *et al.* 2019).

En conclusion, compte tenu du rôle physiologique du peptide A β proposé par les travaux que nous venons de présenter, il semble que son accumulation au sein du cerveau soit en mesure de générer une hyperactivité neuronale. Cette hyperactivité pourra alors être responsable de processus excitotoxiques. Dans la partie suivante nous allons donc nous intéresser au rôle d'A β dans l'excitotoxicité.

2. A β et synaptotoxicité

Les mécanismes exacts expliquant les dysfonctions synaptiques induites par les formes solubles oligomériques d'A β sont encore mal compris. Pour les étudier, l'approche principalement utilisée consiste à réaliser des applications exogènes de solutions d'A β ₀₁₋₄₂ à des concentrations jugées pathogènes sur différents supports (culture cellulaire, tranches organotypiques ou aiguës de cerveau, injection *in vivo*). Ainsi, Busche *et al.* 2012 ont mis en évidence une hyperactivité neuronale au sein de l'hippocampe à la suite d'application de concentrations nanomolaires de dimères d'A β *in vivo*. Il convient donc de s'interroger sur les mécanismes sous-jacents à cette hyperactivité induite par le peptide.

a. Perturbation de la signalisation glutamatergique

Chez l'homme, nous avons vu qu'il semble exister une perturbation de l'homéostasie glutamatergique dans le cadre de la maladie d'Alzheimer avec une altération des transporteurs du glutamate. Les mêmes observations ont été faites chez des modèles murins (Mookherjee *et al.* 2011; Schallier *et al.* 2011). Notamment, il a été montré sur le modèle murin APP/PS1-21

une perturbation de la dynamique du glutamate à proximité des plaques amyloïdes mettant en jeu le transporteur GLT-1 (Hefendehl *et al.* 2016). Une mauvaise clairance du glutamate pourrait donc en partie expliquer l'hyperactivité observée. Mais cela n'exclut pas un effet du peptide sur la probabilité de libération de neurotransmetteurs.

Pour répondre à la question, il convient de s'intéresser au mécanisme de plasticité pré-synaptique. Elle se définit comme le mécanisme associé à la quantité de neurotransmetteurs pouvant être libéré par la terminaison axonale. Elle se met en place rapidement, c'est pourquoi on parle de plasticité à court terme. L'approche expérimentale la plus répandue pour l'étudier est appelée *paired-pulse facilitation* (PPF). Cela consiste à appliquer deux stimulations électriques successives rapprochées (~50 ms) avec le constat que l'amplitude de la réponse à la deuxième stimulation sera plus importante que la première (Citri and Malenka 2008). L'explication mécanistique de ce phénomène est due au fait que la deuxième stimulation intervient alors que le niveau de calcium au niveau de la terminaison axonale n'est pas revenu à un niveau basale suite à la première stimulation. La concentration plus importante de calcium ainsi générée au niveau de la terminaison axonale entraîne une fusion plus importante de vésicules avec la membrane et donc une libération de neurotransmetteurs plus importante que pour la première stimulation. Si l'hyperactivité neuronale induite par A β passait par une augmentation de la probabilité de libération de neurotransmetteur, le protocole de PPF devrait mettre en évidence une différence de réponse plus importante entre les deux stimulations. Or, plusieurs études ont montré que l'application exogène d'A β n'altérerait pas la PPF (Shankar *et al.* 2008; Li *et al.* 2009; Talantova *et al.* 2013). Par ailleurs, nous avons déjà vu que l'hyperactivité neuronale nécessite une activité préexistante pour se mettre en place (Zott *et al.* 2019). A β ne semblent donc pas être directement responsable d'une augmentation de libération de glutamate par l'élément pré-synaptique. Ces résultats indiquent qu'à une concentration pathologique l'activité d'A β diffère du rôle physiologique proposé précédemment.

La perturbation de la signalisation glutamatergique mise en jeu par A β semble donc provenir plutôt d'une altération de la recapture du glutamate. Rappelons que cette fonction de recapture est assurée en majeure partie par le partenaire astrocytaire au niveau de la synapse. Un des mécanismes envisagés désigne A β comme responsable de la production de cytokines proinflammatoires au sein des cellules gliales qui provoquerait l'internalisation des transporteurs du glutamate (Li and Selkoe 2020). Par ailleurs, ces observations ne permettent pas d'exclure

un effet d'A β o sur la gliotransmission, et donc un rôle actif des astrocytes dans l'hyperactivité neuronale. Nous reviendrons sur ce point dans la deuxième partie de cette introduction.

b. Modification de la plasticité synaptique à long terme

La conséquence directe de l'augmentation de la concentration de glutamate est la sur-activation des récepteurs post-synaptiques or nous avons vu qu'une dérégulation de l'homéostasie glutamatergique est responsable de mécanismes excitotoxiques. Ce processus requiert l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques composés de sous-unités NR2B. Ainsi, les travaux de Varga et al. 2014 ont mis en évidence l'implication des récepteurs NMDA contenant NR2B dans l'hyperexcitabilité induite par A β o au sein de l'hippocampe. De plus, nous savons de manière générale que la sur-activation d'un récepteur conduit à un processus de désensibilisation qui se traduit par son internalisation. Il a ainsi été montré une augmentation de l'endocytose des récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B sur des neurones en cultures traitées avec 1 μ M d'A β o pendant une heure (Snyder *et al.* 2005). Plusieurs travaux semblent ainsi confirmer la mise en jeu des récepteurs NMDA extra-synaptiques dans l'effet induit par A β o (pour revue voir Tu et al. 2014; Zhang et al. 2016). Cela semble donc cohérent vis-à-vis des modifications d'expression des récepteurs NMDA observées chez l'homme dont nous avons parlé précédemment.

Les récepteurs NMDA sont les seuls récepteurs au glutamate à laisser entrer du calcium au niveau de l'élément post-synaptique dans un cerveau adulte. La sur-activation de ces récepteurs est par conséquent responsable d'une perturbation de la signalisation calcique neuronale. Plusieurs travaux récents ont ainsi mis en évidence que l'application d'A β o sur des cultures primaires de neurones induisait une augmentation du calcium intracellulaire dépendante des récepteurs NMDA (Ferreira *et al.* 2015; Amar *et al.* 2017). Cette perturbation de l'homéostasie calcique neuronale a également été observée *in vivo* sur des cerveaux de souris suite à l'application d'A β o, avec pour conséquence une diminution du nombre d'épines dendritiques 24h après le traitement (Arbel-ornath *et al.* 2017).

Par ailleurs, les récepteurs NMDA et l'influx de calcium qu'ils génèrent sont nécessaires pour induire les mécanismes de plasticité à long terme (Lau *et al.* 2009). Ceci a été mis en évidence lors d'études de la LTP et la LTD par électrophysiologie. Une LTP altérée voire bloquée a ainsi été mise en évidence chez la plupart des modèles murins dont nous parlerons juste après (Marchetti and Marie 2011; Esquerda-canals, Montoliu-gaya and Jofre 2017) et l'incrimination d'A β o dans cette perturbation fait l'objet d'un consensus dans la littérature (Li and Selkoe

2020). La LTP étant considérée comme le substrat moléculaire de l'apprentissage et de la mémoire sa perturbation paraît tout à fait cohérente avec le phénotype de la maladie d'Alzheimer. La LTD est, quant à elle, plutôt associée à une réduction de l'activité synaptique et à l'élimination des épines dendritiques concernées. Dans un premier temps, la communauté scientifique a étudié l'effet d'A β sur le protocole normalement utilisé pour induire cette LTD (900 stimuli à 1 Hz). Mais contrairement à la LTP, ce mécanisme de plasticité n'est pas altéré par A β , et sa mise en œuvre apparaît facilitée puisqu'elle a pu être induite avec un protocole de seulement 300 stimuli à 1 Hz (Shankar *et al.* 2008; Li *et al.* 2009). En somme, A β bloquerait la potentialisation et favoriserait la dépression synaptique.

L'étude des mécanismes sous-jacents à l'hypothèse amyloïde propose donc la cascade d'évènements suivants pour expliquer le déclenchement de la maladie d'Alzheimer. La perturbation de l'homéostasie glutamatergique induite par A β entraîne l'activation des récepteurs NMDA, avec une mise en jeu particulière des récepteurs extra-synaptiques. Cela va entraîner une modification de la signalisation calcique intraneuronale et donc une modification des mécanismes de plasticité à long terme en favorisant la dépression synaptique (**Figure 11**).

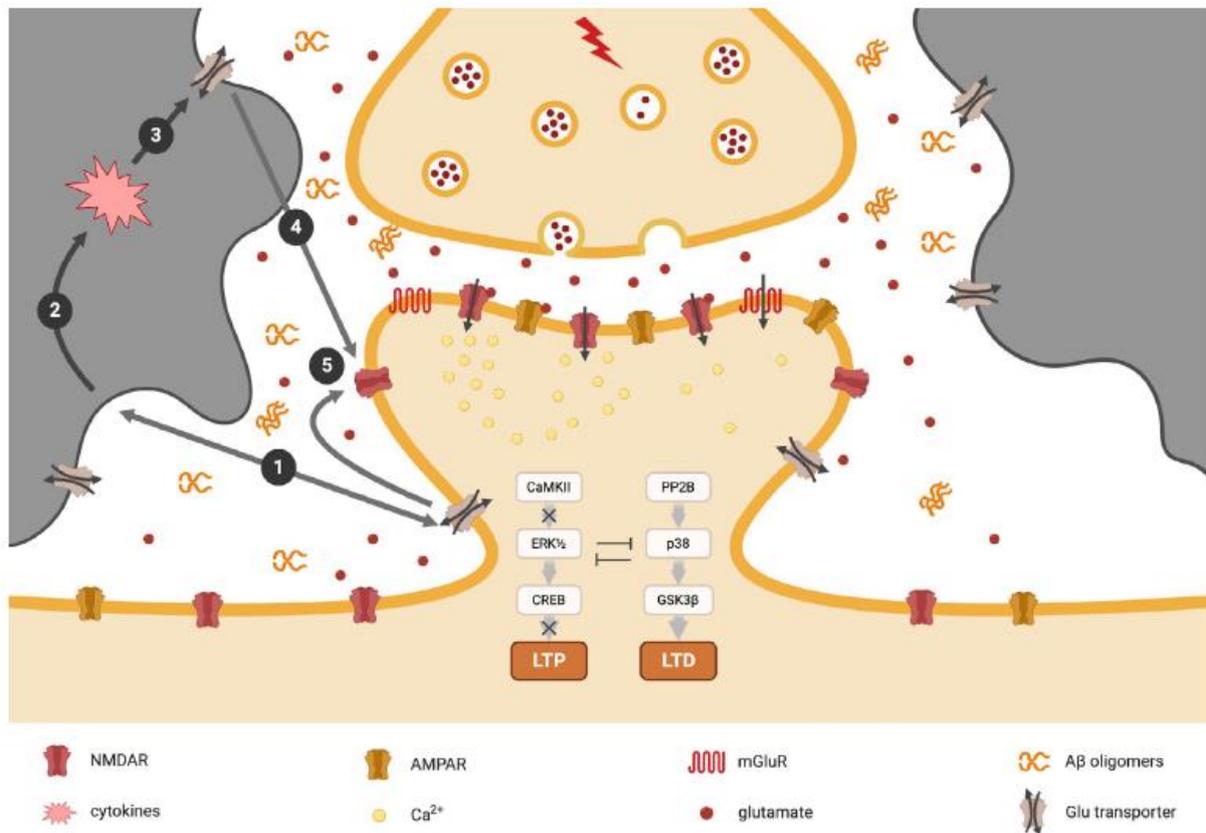


Figure 11 : Hypothèse schématique de la manière dont Aβ pourrait perturber la plasticité synaptique. Lorsque Aβo augmente ou est appliqué de manière exogène les oligomères hydrophobes vont potentiellement se coller à la surface de la membrane lipidique neuronale ou gliale ①, interrompant ainsi ses fonctions physiologiques et stimulant les cellules gliales à libérer des cytokines et les médiateurs inflammatoires associés ②. Cela pourra entraîner la perturbation de la recapture astrocytaire et/ou neuronal du glutamate ③ et par conséquent l’augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate ④. Les concentrations élevées de glutamates extracellulaires activent davantage les récepteurs NMDA extrasynaptiques composés de sous-unités NR2B ⑤ ; ce qui induit une altération de la LTP et une facilitation de la LTD. (Adapté de Li et Selkoe 2020).

E. Modèles murins de la maladie d'Alzheimer

Face à la complexité des mécanismes sous-jacents à l'accumulation des formes solubles d'A β et dans le but de fournir une compréhension holistique de la phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer, il est apparu essentiel d'avoir recours à des modèles animaux de la maladie. Il existe à l'heure actuelle près de 200 modèles murins pour la maladie d'Alzheimer et la plupart des modèles transgéniques correspondent à des souris dites humanisées. En effet, l'A β murin endogène ne diffère de l'A β humain que par trois acides aminés (R5G, Y10F et H13R) mais ces mutations semblent suffisantes pour prévenir l'agrégation du peptide et donc ses effets délétères. Les modèles ont donc été générés à partir de l'insertion de gènes humains dans le génome des souris, permettant la production de la forme humaine du peptide (pour revue voir Esquerda-canals, Montoliu-gaya and Jofre 2017). Les gènes insérés correspondent à ceux identifiés dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Pour rappel, ces formes familiales correspondent à des mutations observées sur les gènes de l'APP, de PS1 et PS2, qui ont toutes pour conséquence une augmentation du niveau de production du peptide A β . Ainsi, parmi les modèles générés, il en existe plusieurs qui permettent d'étudier l'hypothèse amyloïde dans la pathogénèse de la maladie. Ils peuvent être regroupés en deux principales catégories (**Tableau 1**).

1. Modèles basés sur la surproduction d'A β

La première catégorie de modèle abordée ici correspond également à la première mise au point historiquement. Il s'agit de souris exprimant une forme humaine mutée du gène APP. A l'instar de la pathologie humaine, les souris générées à partir de cette modification génique, présentent toutes une apparition de plaques séniles à un âge plus ou moins tardif. A l'heure actuelle 67 mutations du gène de l'APP ont été observées, parmi lesquelles 51 semblent pathogéniques. Le choix des mutations utilisées parmi celles identifiées s'est donc basé sur la différence de pathogénicité avec un déclenchement de la maladie le plus précoce possible pour des raisons de praticité expérimentale (Esquerda-canals, Montoliu-gaya and Jofre 2017). Ainsi, la mutation la plus couramment retrouvée dans les différents modèles correspond à la double mutation K670N/M671L également appelée *Swedish* ou APP_{Swe} (Citron *et al.* 1992). Cette mutation favorise le clivage par la β -sécrétase permettant une augmentation massive de la production d'A β . Parmi les différents modèles utilisant cette mutation, il a été rapporté, outre l'apparition de plaques, des troubles d'apprentissage et de la mémoire, des signes d'inflammation gliale ainsi que des dystrophies synaptiques ou neuritiques. Ces différentes caractéristiques n'apparaissent pas aux mêmes âges en fonction des modèles. Cela s'explique par le fait que la

Tableau 1 : Caractéristiques physiopathologiques de différents modèles murins de la maladie d'Alzheimer couramment utilisés. (Adapté d'Esquerda-Canals *et al.* 2017)

Line	Mutation	Isoform	Promoter	Genetic Background	General pathology
<i>APP models</i>					
PDAPP	A β PP _{Ind}	695 < 751,770	Human PDGF- β	C57BL/6 \times DBA/2	Extracellular ThS-A β deposits, neuritic plaques, synaptic loss, astrocytosis and microgliosis, cognitive and behavioral impairment since 3 mo.
Tg2576	A β PP _{Swe}	695	Hamster PrP	C57BL/6 \times SJL	5-fold increase in A β ₄₀ and 14-fold increase in A β _{42/43} . Numerous A β plaques in cortical and limbic structures. Learning and memory impairment by 9-10 mo.
APP23	A β PP _{Swe}	751	Mouse Thy-1	C57BL/6J	7-fold overexpression of A β PP. Senile plaques (congo red-positive and p-tau immunoreactive), neuritic changes, dystrophic cholinergic fibers and gliosis detected at 6 mo.
TASD-41	A β PP _{Swe,Lon}	751	Mouse Thy-1	C57BL/6J	Amyloid plaques since 3-4 mo. Neuritic and synaptic dystrophy, and tau pathology.
J20	A β PP _{Swe,Ind}	695 < 751, 770	Human PDGF- β	C57BL/6 \times DBA/2	High levels of A β ₄₂ , amyloid plaques, synaptic dystrophy.
TgCRND8	A β PP _{Swe,Ind}	695	Hamster PrP	Hybrid C3H/He-C57BL/6	High levels of A β ₄₂ and ThS-A β deposits at 3 mo. Neuritic pathology evident at 5 mo. Early cognitive impairment since 3 mo.
<i>APP+PS1 models</i>					
PSAPP	A β PP _{Swe} PS1 _{M146L}	695	Hamster PrP Human PDGF- β	Tg2576 \times C3H	High levels of A β ₄₂ . Fibrillar A β deposits earlier than Tg2576 mice.
2xKI	A β PP _{Swe} PS1 _{P264L}	695	MA β PP mPS1	129 \times Tg2576	Elevated A β ₄₂ /A β ₄₀ ratio at 1 mo. Accelerated amyloid deposition and gliosis.
5xFAD	A β PP _{Swe,Lnd,Flo} PS1 _{M146L,L286V}	695	Thy-1 Thy-1	C57BL/6 \times SJL	High intracellular levels of A β ₄₂ at 1.5 mo. Extracellular A β deposition and gliosis since 2 mo. Synaptic dystrophy, neuronal loss, and cognitive impairment at 4 mo.
3xTg-AD	A β PP _{Swe} tau _{P301L} PS1 _{M146V}	695 4R	Thy1.2 Thy1.2 mPS1	129X1/SvJ \times 129S1/Sv	Intracellular A β ₄₂ , synaptic dysfunction and cognitive impairment since 3-4 mo. Extracellular amyloid deposits since 6 mo and tau pathology at 12 mo.

mutation APP_{swe} aura pu être couplée ou non avec d'autres mutations pour accélérer le phénotype. Cela pourra aussi être dû au promoteur utilisé pour contrôler l'expression du transgène. En effet, il est important de mentionner que pour tous ces modèles, les transgènes sont placés sous le contrôle de promoteurs quasi exclusivement spécifiques des neurones. Ainsi parmi les plus courants, on retrouve ceux du *platelet-derived growth factor β -chain* (PDGF), du *thymocyte differentiation antigen 1* (Thy-1) et de la protéine du prion (PrP). Il faut donc garder à l'esprit, qu'à l'heure actuelle, la plupart des modèles utilisés reposent sur une surproduction uniquement neuronale avec une accumulation intra-neuronale avant qu'il y ait sécrétion d'A β dans le milieu extracellulaire (LaFerla, Green and Oddo 2007). Les preuves de ce mécanisme chez l'homme n'ont pas été clairement établies et une production d'A β par les cellules gliales n'est pas à exclure (Frost and Li 2017).

La deuxième catégorie de modèles s'inscrit dans la volonté d'accélérer davantage l'âge de déclenchement des différents phénotypes observés en combinant une ou des mutations d'APP avec un transgène correspondant à une ou des mutations de PS1. Les modèles proposant uniquement une mutation liée au gène de PS1 ont rapidement été mis de côté car malgré l'augmentation de la proportion d'A β produite, ces modèles ne présentaient pas de plaques amyloïdes (Chui *et al.* 1999). Cela peut s'expliquer par la plus faible capacité d'agrégation de l'A β murin par rapport à la forme humaine du peptide. Les modèles combinant les deux transgènes ont démontré un effet synergique permettant d'accélérer l'apparition de certains phénotypes associés à la maladie d'Alzheimer. Dans le cas du gène PS1, 230 mutations ont été identifiées chez l'homme dont 219 semblent pathogéniques. Parmi celles-ci, le choix pour générer les modèles murins s'est porté sur celles qui clivent APP en favorisant la production de la forme A β ₁₋₄₂ du peptide (Esquerda-canals, Montoliu-gaya and Jofre 2017). Cette volonté de créer un modèle avec une pathophysiologie accélérée s'est traduite par la création du modèle 5xFAD qui porte cinq mutations provenant des formes familiales, comme son nom l'indique, dont trois sur le gène d'APP et deux sur PS1 (Oakley *et al.* 2006). Cela a donné lieu à des souris avec un phénotype pathologique extrêmement agressif, une apparition de plaques séniles dès 2 mois et une altération des fonctions cognitives dès 4 mois. Mais le principal défaut de ce modèle semble être un manque de spécificité de la neurotoxicité qui se généralise à tout type de sous-populations neuronales, ce qui donne notamment lieu à des déficits moteurs à partir de 9 mois (O'Leary *et al.* 2018).

Même si ces deux catégories de modèles reproduisent certaines caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, elles ne les reproduisent pas toutes.

Notamment, une très faible proportion voire une absence de mort neuronale est constatée dans la plupart de ces modèles alors que les déficits cognitifs surviennent relativement rapidement (Selkoe 2011). De plus, bien qu'une augmentation des formes phosphorylées de tau ait été mesurée, la plupart de ces modèles ne présentent pas d'enchevêtrements neurofibrillaires associés à la protéine tau, alors qu'il s'agit d'un des deux marqueurs de la maladie. C'est pourquoi dans le but de développer un modèle plus complet de la maladie Oddo *et al.* 2003 ont développé un modèle triple transgénique ou dit 3xTg en ajoutant un gène humain muté de tau. Rappelons qu'aucune mutation de tau n'a été clairement mise en lien avec les formes familiales ou sporadiques de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, ce modèle permet d'étudier la surproduction d'A β dans un contexte de tauopathie.

Par ailleurs, comme nous l'avons dit ces modèles sont basés sur les formes familiales de la maladie d'Alzheimer qui sont des formes agressives et qui ne correspondent qu'à une très faible proportion du nombre de cas. C'est pourquoi de nouveaux modèles se rapprochant plus des formes sporadiques sont en train d'être étudiés. Il existe par exemple un modèle associant deux mutations d'APP avec l'insertion d'un allèle $\epsilon 4$ du gène de l'APOE (Graybeal *et al.* 2015). Nous pouvons également citer l'exemple des souris APP23 qui ont été croisées avec un modèle murins de désensibilisation à l'insuline (Gao, Liu and Li 2013), puisque le diabète de type II constitue aussi un facteur de risque observé dans les formes sporadiques. Malgré tout, l'élaboration de modèles mimant les formes sporadiques semble difficile à réaliser compte tenu du fait que l'A β produit à partir de l'APP murin endogène semble peu toxique et qu'aucune caractéristique pathologique de la maladie d'Alzheimer n'est observée chez la souris à moins d'insérer un gène humain muté de l'APP dans son génome.

2. Modèle APP/PS1-21

Le modèle qui a été utilisé pour les travaux présentés dans ce manuscrit correspond au modèle APP/PS1-21. Ce modèle a été mis au point au sein du laboratoire du professeur Mathias Jucker (Radde *et al.* 2006). Il contient les transgènes humains de l'APP_{swe} et de PS1 avec la mutation L166P qui sont tous les deux sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1. L'utilisation du promoteur Thy-1 permet un début d'expression aux alentours de la deuxième semaine post-natale, évitant ainsi de générer des perturbations lors du développement embryonnaire, avec une expression qui reste constante dans le cerveau adulte et qui est forte notamment au niveau de l'hippocampe (Caroni 1997; Porrero *et al.* 2010). On observe ainsi chez ces souris, une expression trois fois supérieure de l'APP humain par rapport à l'APP murin grâce à la mutation *Swedish*. Concernant PS1, la mutation L166P conduit à un clivage d'APP largement en faveur

de la forme $A\beta_{1-42}$ par rapport à la forme $A\beta_{1-40}$ avec des quantités détectables au niveau du cerveau dès 1 mois. Cela a pour conséquence une apparition précoce de différentes caractéristiques pathologiques associées à la maladie d'Alzheimer (**Figure 12**). Ces souris constituent donc un modèle tout à fait pertinent dans le cadre d'une étude sur les effets des formes solubles d' $A\beta_{1-42}$ sur la synaptotoxicité. Cependant, comme cela a été dit précédemment pour les autres modèles, la perte neuronale est très faiblement observée et à un âge tardif (17 mois) ce qui fait douter de son lien avec la surproduction d' $A\beta$ (Rupp *et al.* 2011). Malgré cette faible perte neuronale, des déficits cognitifs liés à une perturbation de l'apprentissage et de la mémoire spatiale ont été observés aux alentours de 7 mois dans ce modèle (Radde *et al.* 2006; Serneels *et al.* 2009). A l'instar de la maladie d'Alzheimer chez l'homme, ce modèle présente une perte de synapses vers 3 mois environ qui survient après l'apparition des premières plaques amyloïdes dans le cortex et en même temps que celles qui apparaissent dans l'hippocampe

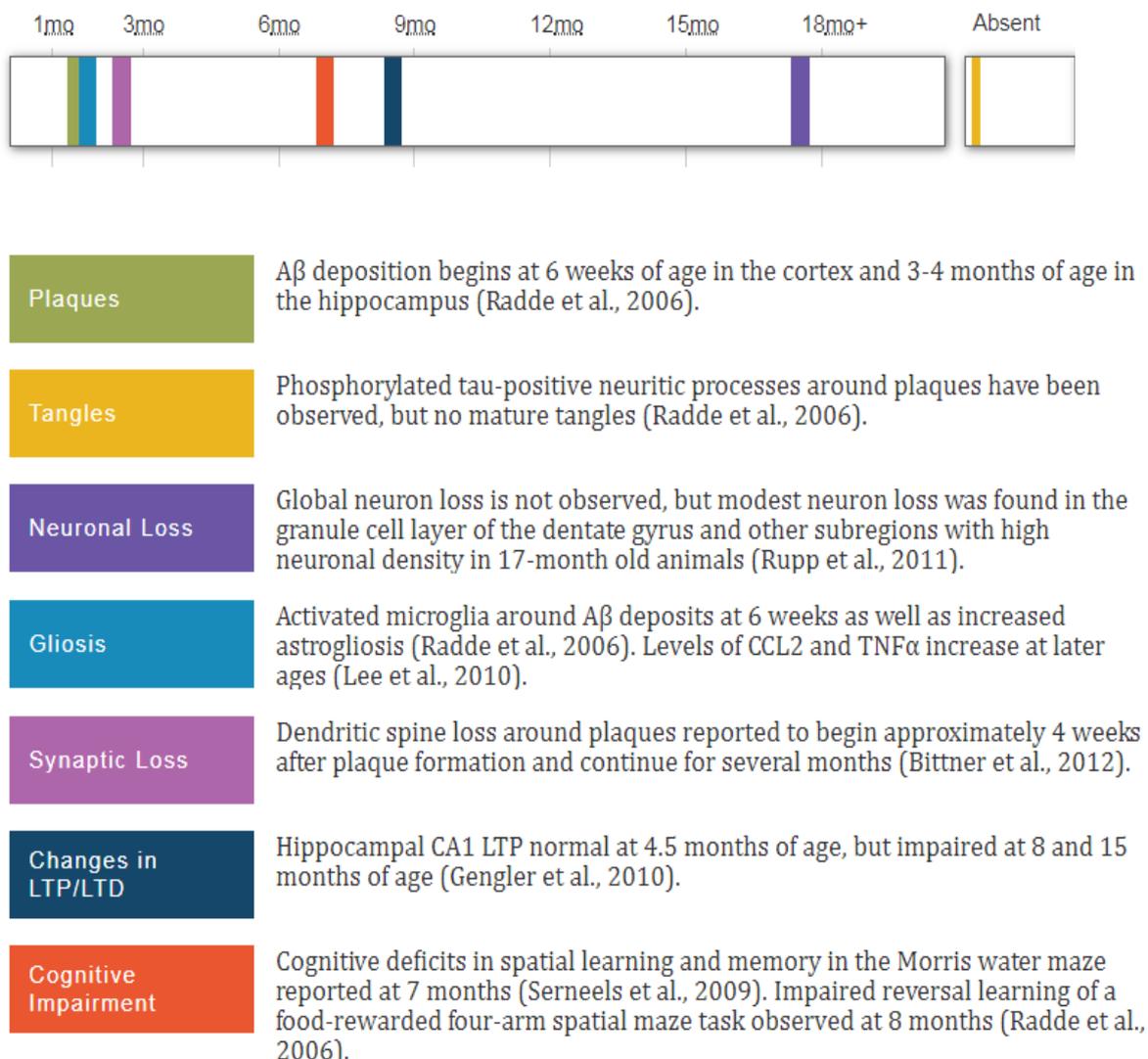


Figure 12 : Caractérisation phénotypique du modèle murin APP-PS1-21. (Source : Alzforum.org)

(Bittner *et al.* 2012). Ces observations suggèrent donc un rôle de premier plan pour la perte de synapses dans l'apparition des troubles cognitifs. En revanche, il semblerait que des altérations de la plasticité à long terme, mises en évidence par l'étude de la LTP, ne surviennent pas avant 8 mois chez ces souris (Gengler, Hamilton and Ho 2010). Il serait également intéressant de déterminer si la perte synaptique précoce ne pourrait pas être en lien avec une facilitation des mécanismes de dépression synaptique mais à ce jour aucune étude n'a été publiée sur la LTD dans ce modèle. Par ailleurs, l'absence d'enchevêtrements protofibrillaires et l'absence de mort neuronale, laissent imaginer un lien étroit entre l'agrégation de tau phosphorylée et la mort cellulaire comme cela avait été suggéré par les travaux de Rapoport *et al.* 2002. C'est pourquoi l'étude des mécanismes qui sous-tendent la synaptotoxicité au cours des stades précoces chez ces animaux constitue un axe de recherche intéressant afin de mieux comprendre l'origine des troubles mnésiques associés à la maladie.

3. Phase cellulaire chez les modèles murins

Chez l'homme, nous avons vu que les stades précoces de la maladie sont caractérisés par une hyperactivité neuronale, notamment au sein de l'hippocampe. Les premières observations de cette hyperactivité neuronale chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer ont été apportées par électroencéphalographie *in vivo* sur des souris hAPP-J20 (double transgène APP avec les mutations *Swedish* et *Indiana*) âgés de 3 à 7 mois (Palop *et al.* 2007). Par la suite, plusieurs études ont confirmé la présence d'une hyperactivité neuronale au sein de différents modèles murins (pour revue voir Marchetti and Marie 2011; Frere and Slutsky 2017). Cependant, les stades précoces, que nous décrivons comme antérieurs à l'apparition des plaques amyloïdes, ont été peu étudiés jusqu'à maintenant. Néanmoins, les travaux du laboratoire du professeur Konnerth ont montré une hyperactivité neuronale au sein de l'hippocampe de souris APP23xPS45 sur des animaux de 1,5 mois et mettent en évidence une altération de l'homéostasie calcique des neurones hippocampiques (**Figure 13**) (Busche *et al.* 2012). Chez ce modèle, les plaques apparaissent vers 6 mois dans l'hippocampe. Ces travaux nous permettent de considérer cette hyperactivité comme l'un des premiers éléments associés à la surproduction d'A β et d'envisager l'hypothèse de l'excitotoxicité comme étant pertinente. A partir de ce constat, il paraîtrait intéressant de cibler les éléments responsables de cette hyperactivité dépendante de l'accumulation d'A β dans une optique thérapeutique afin de potentiellement limiter la progression de la maladie d'Alzheimer.

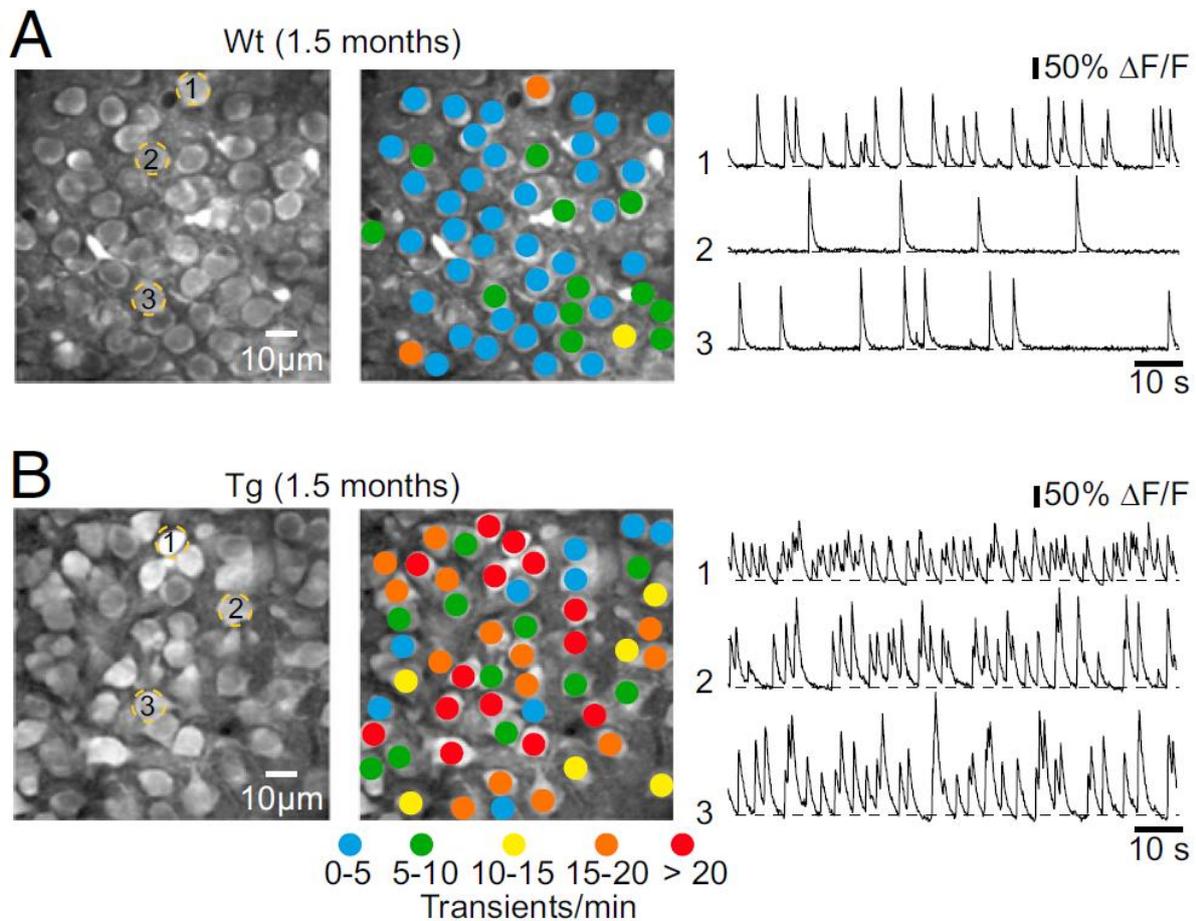


Figure 13 : Hyperactivité anormale des neurones hippocampiques de souris transgéniques APP23xPS45 avant l'apparition des plaques (B) par rapport à des souris contrôle du même âge (A). (Gauche) neurones hippocampiques CA1 imagés *in vivo* chez une souris de type sauvage (Wt) et une souris transgénique (Tg). (Centre) Cartes d'activité, dans lesquelles la teinte est déterminée par la fréquence des augmentations transitoires et spontanées de Ca^{2+} , superposées à l'image anatomique. (Droite) Exemple de profils d'activités calciques spontanés de 3 neurones identifiés sur l'image de gauche (1,2 et 3) (Adapté de Busché et al. 2012).

F. Traitements de la maladie d'Alzheimer

Depuis sa découverte la maladie d'Alzheimer a été la cible d'un grand nombre de stratégies thérapeutiques. Nous pouvons par exemple citer l'utilisation d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans le but d'augmenter la disponibilité synaptique de l'acétylcholine afin de compenser la disparition des neurones cholinergiques (Anand and Singh 2013). L'utilisation de ces inhibiteurs a démontré une modeste amélioration des performances cognitives lors d'une administration en phase clinique avancée (Birks 2006). En revanche, son utilisation en tout début de phase clinique semble aggraver les performances cognitives (Han *et al.* 2019). Or, comme nous l'avons vu, une intervention précoce semble être nécessaire pour endiguer la cascade d'évènements pathophysiologiques. Au regard de ce que nous venons de

présenter, nous allons donc nous pencher plus particulièrement sur les approches thérapeutiques en lien avec l'hypothèse amyloïde. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux stratégies visant à limiter l'accumulation du peptide A β puis dans un second temps, nous nous intéresserons aux stratégies visant à limiter l'hyperactivité subséquente à l'accumulation du peptide.

1. Réduction de l'accumulation d'A β

a. Immunothérapie

Avec le développement de l'immunothérapie dans d'autres pathologies, comme par exemple le traitement de certains cancers (Ferrini, Melioli and Moretta 1990) ou le traitement du SIDA (Dalglish 1992), a émergé l'idée de cibler directement A β avec des anticorps pour augmenter sa clairance. Cela a été mis en évidence en premier lieu sur des souris PDAPP, correspondant au tout premier modèle murin exprimant l'APP humain avec la mutation *Indiana* (Games *et al.* 1995). Ces souris ont reçu un vaccin permettant de générer des anticorps dirigés contre l'A β ₁₋₄₂ humain (immunisation active). Le vaccin chez des souris jeunes permettait d'empêcher l'apparition de plaques et le vaccin chez des souris plus âgées permettait de réduire la quantité de plaques (Schenk *et al.* 1999). Mais lorsque cette stratégie d'immunisation active a été transposée chez l'homme lors d'essais cliniques, il a été constaté que tous les patients ne répondaient pas au vaccin ou à l'inverse répondaient de manière excessive. Chez ces derniers, cela entraînait une méningite non infectieuse (Long and Holtzman 2019). Toujours dans le cadre de cette stratégie d'immunothérapie, une approche différente appelée immunisation passive est également à l'étude. Elle vise à infuser directement les anticorps aux patients. Cela permet un meilleur contrôle de la quantité d'anticorps présents dans l'organisme et donc un plus faible risque de déclencher une réponse inflammatoire. Cette approche a permis à plusieurs thérapeutiques d'aller jusqu'en phase 3 d'essais cliniques comme par exemple l'aducanumab qui correspond à un anticorps IgG1 humain monoclonal qui reconnaît spécifiquement un épitope conformationnel d'A β . Les effets de cet anticorps semblaient très prometteurs notamment vis-à-vis de son efficacité à dégrader les plaques amyloïdes (Sevigny *et al.* 2016). Après avoir été abandonnés en mars 2019 car le traitement a été jugé inefficace (Selkoe 2019), les essais cliniques avec cette anticorps ont repris en janvier 2020. En effet, l'essai clinique baptisé *Emerge* a montré une diminution de 40 % du déclin cognitif en rapport avec les activités quotidiennes grâce à ce traitement (Walsh and Selkoe 2020). Ces données récentes apportent un peu d'espoir vis-à-vis de l'immunothérapie qui était très largement mise en échec jusqu'à maintenant par manque d'efficacité sur le ralentissement du déclin cognitif.

b. Inhibition des sécrétases

Une autre possibilité pour limiter la quantité d'A β consiste à cibler les enzymes responsables du clivage d'APP et donc responsables de la production du peptide. Comme nous l'avons vu précédemment, la production d'A β nécessite l'activité de la β - et γ -sécrétase.

Deux inhibiteurs de la γ -sécrétase ont ainsi été testés cliniquement mais cette stratégie a rapidement été abandonnée au regard de l'importance des effets secondaires observés (nausée, vomissement, diarrhée, augmentation de l'incidence de cancer de la peau ...). Rappelons que la γ -sécrétase est également impliquée dans la voie non-amyloïdogénique de clivage d'APP. Ces effets indésirables s'expliquent donc par le blocage de la production d'autres produits de clivage d'APP. En effet les fragments intracellulaires produits par le clivage de la γ -sécrétase jouent un rôle dans la physiologie cellulaire et notamment dans la voie de signalisation de Notch (Leissring *et al.* 2002; De Strooper 2014). De plus, parmi les substrats de la γ -sécrétase on retrouve un grand nombre d'autres protéines membranaires comme par exemple les cadhérines N et E qui pourraient notamment expliquer la survenue de cancer associée à ces traitements (Wolfe 2009).

La stratégie visant la β -sécrétase (BACE1) semblait plus pertinente dans la mesure où cette protéase est spécifique de la voie de clivage amyloïdogénique d'APP. Parmi les essais cliniques qui ont été réalisés jusqu'à maintenant, plusieurs effets secondaires ont été rapportés comme des aggravations de fonctions cognitives ou encore de la perte de poids. Ces effets viennent du fait que l'APP ne semble pas être le seul substrat de cette protéase comme cela a été mis en évidence sur des souris *knock-out* pour le gène de BACE1 (Long and Holtzman 2019).

En somme, il apparaît que la stratégie visant à bloquer la production d'A β n'est pas pertinente à cause du rôle des enzymes ciblées qui sont impliquées dans d'autres voies de signalisation. Une alternative à cette stratégie consisterait à utiliser des modulateurs plutôt que des inhibiteurs, afin de réduire l'activité de ces protéases plutôt que de les inhiber dans le but de limiter l'apparition d'effets secondaires.

2. Réduction de l'hyperactivité neuronale

Comme nous l'avons vu, les récepteurs NMDA semblent être impliqués dans la neurotoxicité médiée par la perturbation de l'homéostasie glutamatergique. Une des stratégies thérapeutiques actuelles consiste à utiliser la mémantine qui est un inhibiteur non compétitif de faible affinité des récepteurs NMDA, ce qui lui permet d'agir comme un modulateur n'empêchant pas une activité résiduelle des récepteurs. La mémantine est plutôt bien tolérée et son utilisation a

montré un léger effet bénéfique sur les formes modérées à sévères de la maladie (McShane *et al.* 2019). Cependant, sa prescription n'est plus recommandée en France depuis 2016 d'après un communiqué de la Haute Autorité de Santé qui juge son intérêt médical comme insuffisant.

Ce manque d'efficacité pourrait sans doute venir de différents facteurs. Comme nous l'avons vu, il semblerait que ce sont les récepteurs NMDA extra-synaptiques qui sont mis en jeu dans la toxicité induite par A β . Cet élément pourrait donc expliquer qu'une modulation à large spectre de l'ensemble des récepteurs NMDA n'ait qu'un effet modéré sur l'excitotoxicité. Une autre explication pourrait être que l'hyperactivité semble être plutôt associée aux stades précoces précliniques de la maladie. Or, dans tous les tests réalisés les patients étaient symptomatiques (Kishi *et al.* 2017). L'utilisation de la mémantine nécessiterait donc une étude longitudinale à partir de patients MCI pour conclure plus précisément sur son utilité.

En conclusion, à l'heure actuelle, les thérapeutiques visant à éliminer le peptide A β ou l'hyperactivité subséquente à son accumulation, semblent insuffisantes pour proposer une réelle solution aux patients. Ces stratégies reposent sur des hypothèses et des constats de dysfonctions synaptiques centrés sur les neurones. Récemment, Dominic Walsh et Dennis Selkoe ont publié une revue dans laquelle ils suggèrent de considérer d'autres éléments dans la cascade amyloïde, comme l'astroglie ou l'activation microgliale impliquées dans la cascade inflammatoire, ou encore la perturbation de l'homéostasie d'un ensemble de molécules associée à la maladie d'Alzheimer (Walsh and Selkoe 2020). D'après ces auteurs, cela permettrait de dégager de nouvelles stratégies thérapeutiques, voire probablement de mettre en place des thérapies combinatoires comme c'est le cas pour l'athérosclérose. Nous avons vu brièvement que les neurones ne sont pas les seuls acteurs à intervenir au niveau de la régulation de la fonction synaptique. En effet, l'astrocyte intervient notamment dans la recapture du glutamate qui semble faire défaut dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, mais ce n'est pas son seul rôle. Dans la deuxième partie de cette introduction nous allons donc nous focaliser sur l'astrocyte et son rôle au sein de la synapse dans un contexte physiologique et pathologique. Nous décrirons également l'intérêt récent de les cibler dans les futures stratégies thérapeutique.

A. Présentation générale des astrocytes

La glie ou neuroglie est un terme qui renvoie aux cellules gliales. Il s'agit de toutes les cellules non neuronales qui composent le système nerveux central (SNC). Une des caractéristiques qui définit les neurones est la capacité à se dépolariser pour propager des signaux électriques appelés potentiels d'action. La dénomination de cellules gliales s'est ainsi faite par opposition à cette propriété neuronale. En 1856, Rudolph Virchow décrivait la glie comme étant simplement du tissu de soutien dans lequel s'intègre le réseau de neurones. Aujourd'hui, nous savons que dans le cerveau des mammifères, cette catégorie renvoie à plusieurs types de cellules avec différents rôles qui sont essentiels au sein du cerveau. Le type cellulaire le plus abondant parmi celles-ci est l'astrocyte. En effet, le cerveau humain est composé à 50 % de cellules gliales, et même si les proportions varient d'une structure à une autre, on estime que les astrocytes à eux seuls représentent 20 % de toutes les cellules du cerveau (von Bartheld, Bahney and Herculano-houzel 2016). Le terme astrocyte a été introduit par Michael von Lenhossék en 1895 et fait référence à la morphologie étoilée de ces cellules. Mais ce sont les travaux de Ramon y Cajal au tout début du XX^{ème} siècle qui ont permis la démocratisation de cette appellation (**Figure 14**). Il a notamment développé une coloration basé sur le chlorure aurique et le chlorure de mercure qui permet de marquer spécifiquement les astrocytes en marquant

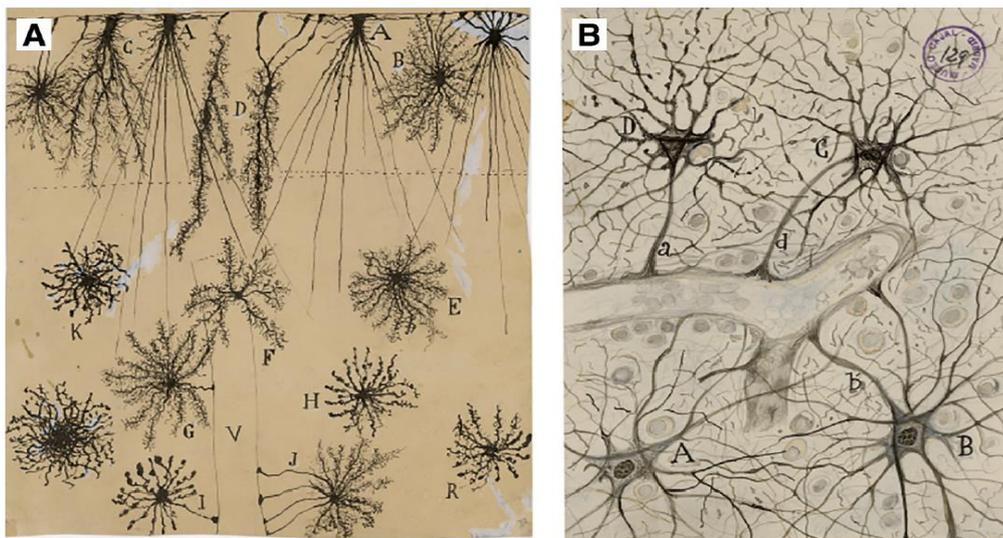


Figure 14 : Images d'astroglie dessinées par Ramon y Cajal au début du XXème siècle. A : Glie corticale humaine après coloration de Golgi dans la couche plexiforme (A-D), dans la deuxième et troisième couche (respectivement E-H et K, R), et glie périvasculaire (I et J) à proximité d'un vaisseau sanguin (V). **B :** astrocytes périvasculaires.

sans le savoir la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Garcia-Marin, Garcia-Lopez and Freire 2007). Cette coloration a permis de marquer les prolongements astrocytaires et donc de mettre en évidence tout la complexité et la diversité morphologique de ces cellules. La GFAP est une protéine des filaments intermédiaires et qui constitue un des marqueurs de prédilection pour cibler les astrocytes, tant pour les expériences d'immunohistochimie que pour l'utilisation de son promoteur dans le but d'induire des expressions géniques spécifiquement astrocytaires (Verkhatsky and Nedergaard 2018). La diversité morphologique des astrocytes permet de distinguer deux sous-populations principales. Les astrocytes fibreux d'une part, que l'on retrouve dans la substance blanche et les astrocytes protoplasmiques de l'autre, observés au sein de la substance grise. Dans l'hippocampe, région qui concentre le travail présenté dans cette thèse, on observe uniquement des astrocytes protoplasmiques. Cette sous-population est la plus représentée parmi les astrocytes. Chez les rongeurs, elle se caractérise par des cellules ayant un soma de 10 μm de diamètre environ, avec en général 5 à 10 prolongements primaires à partir desquels va s'élaborer une arborisation extrêmement dense de prolongement plus fins qui confèrent un aspect spongiforme à ces cellules (**Figure 15A**). Le territoire occupé par un

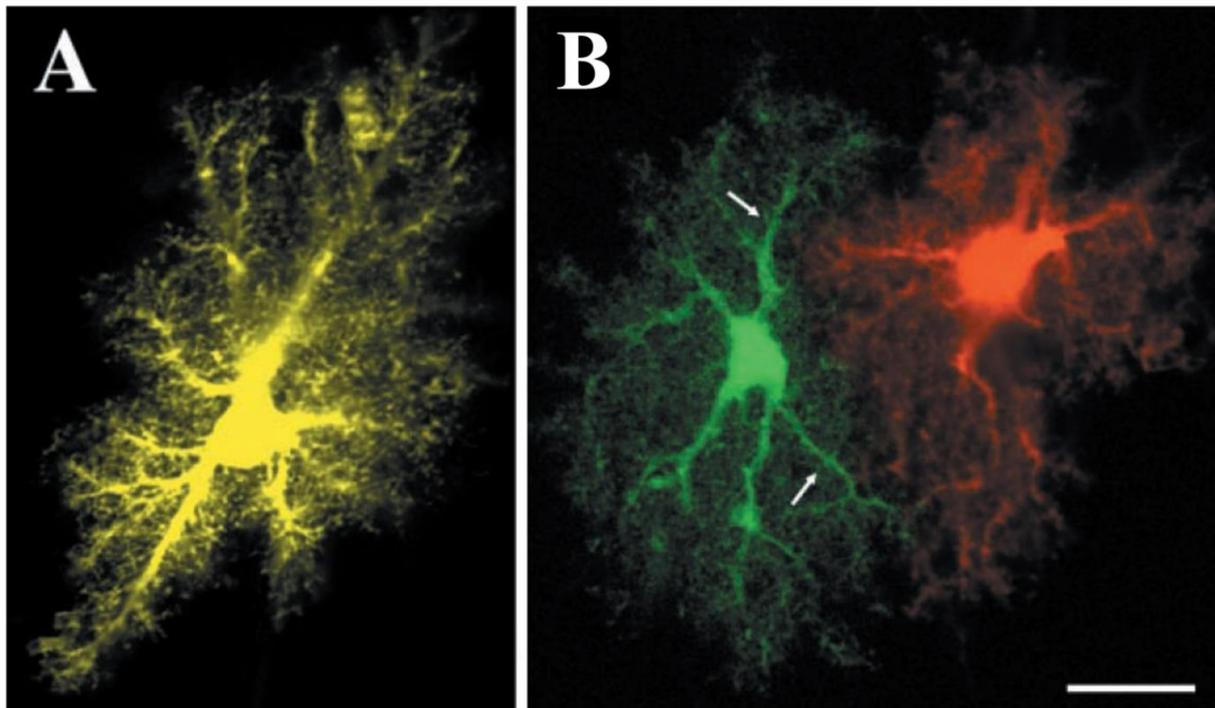


Figure 15 : Astrocytes protoplasmiques de l'hippocampe marqués par diffusion d'une sonde fluorescente après fixation. (A) Un astrocyte marqué avec de l'Alexa 488 révèle une morphologie spongiforme. **(B)** Un astrocyte marqué avec de l'Alexa 488 (vert) et un astrocyte voisin marqué avec de l'Alexa 568 (rouge) montrent une occupation de territoire distincte. L'approche tangentielle des prolongements primaires (flèches blanches) de l'astrocyte de gauche par rapport au territoire de l'astrocyte de droite, laisse penser à un développement a posteriori. Barre d'échelle 15 μm (Adapté de Bushong et al. 2002).

astrocyte protoplasmique correspond à une surface qui varie de 50 000 à 80 000 μm^3 . Une étude menée sur des astrocytes protoplasmiques au sein du cortex de cerveau de souris a permis d'estimer que le territoire d'un seul astrocyte couvrait entre 300 et 600 dendrites, ce qui peut représenter jusqu'à 120 000 synapses (Halassa *et al.* 2007). Il est intéressant de constater que les territoires occupés par des astrocytes voisins sont distincts et ne se superposent pas (**Figure 15B**) (Bushong *et al.* 2002).

Cependant, même s'il n'y a pas de superposition entre les territoires astrocytaires, nous savons que la frontière entre deux territoires adjacents fait l'objet d'un grand nombre de contacts au niveau desquels il a été observé des jonctions communicantes (*gap-jonction*). Chez l'astrocyte, les composants de ces jonctions communicantes sont principalement la connexine 30 (Cx30) et la connexine 43 (Cx43) (**Figure 16A**). Outre la possibilité de laisser passer l'eau, ces jonctions permettent la circulation de plusieurs types de molécules avec une taille inférieure à 1,2 kDa (pour revue voir Giaume *et al.* 2010). Cette propriété permet aux astrocytes d'une même

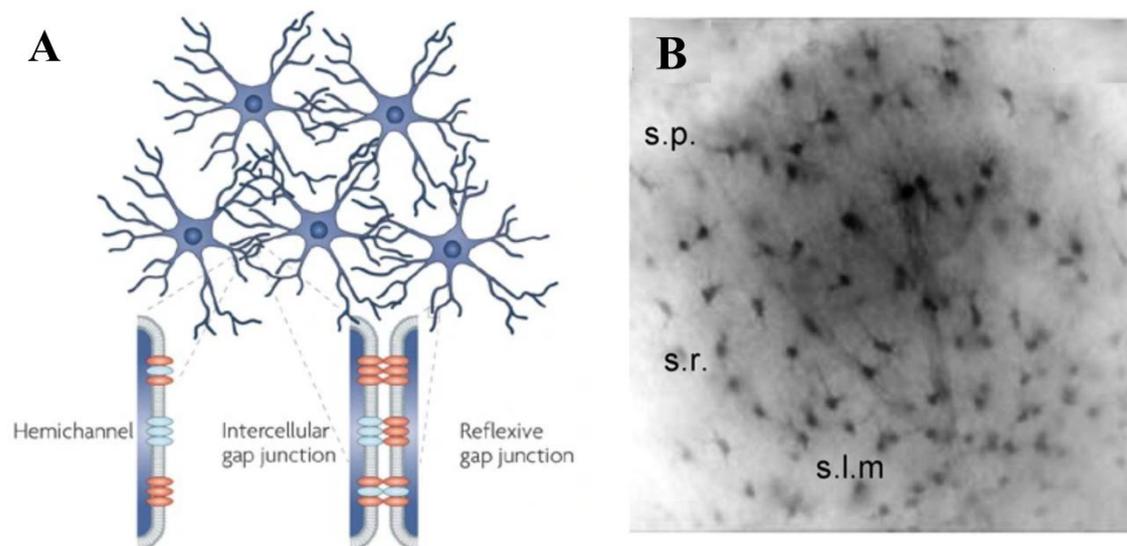


Figure 16 : Organisation des astrocytes en réseau via des jonctions communicantes (*gap-jonction*). (A) Localisation et structure des canaux de connexine dans les astrocytes. Les territoires occupés par des astrocytes voisins ne se chevauchent pas et les canaux de jonction intercellulaires sont situés aux points de contact entre astrocytes voisins. Au sein d'un même astrocyte, un prolongement peut entrer en contact avec un autre et former des jonctions interstitielles "réflexives". Les connexines peuvent également fonctionner comme des hémicanaux à la surface de la membrane cellulaire pour échanger des substances avec le milieu extracellulaire. Comme les astrocytes expriment principalement deux connexines on peut rencontrer plusieurs combinaisons de Cx43 (bleu) et de Cx30 (rouge). (Adapté de Giaume *et al.* 2010). (B) Mise en évidence du couplage astrocytaire dans une tranche aigue d'hippocampe de souris, obtenus après diffusion de la biocytine à partir d'une seule cellule, maintenue en *patch-clamp* cellule entière pendant 20 min. s.p., *stratum pyramidale*; s.r., *stratum radiatum*; s.l.m., *stratum lacunosum moleculare* (Adapté de Wallraff *et al.* 2006).

structure d'être interconnectés les uns aux autres et de former un réseau. Par exemple, sur des tranches aiguës d'hippocampe de souris, l'utilisation du *patch-clamp* en configuration cellule entière sur un astrocyte avec une micropipette contenant de la biocytine (372,48 Da) a permis d'observer la diffusion de cette dernière à travers plus d'une centaine d'astrocytes au bout de 20 min (**Figure 16B**) (Wallraff *et al.* 2006).

B. Principales fonctions homéostatiques astrocytaires

La morphologie complexe des astrocytes leur permet de faire contact et d'interagir avec différents types de cellules qui composent ou qui sont présentes au sein du SNC. Cette caractéristique confère donc à l'astrocyte un rôle important dans le maintien de l'homéostasie au sein du cerveau. Dans cette partie, nous allons passer en revue quelques fonctions principales associées à ce rôle de régulation, indépendamment des interactions avec les neurones qui seront traitées dans une autre partie.

1. Homéostasie ionique et osmolarité

L'homéostasie ionique est essentielle au sein du SNC puisqu'elle est à la base des gradients de concentration des différents ions qui permettent l'excitabilité. Grâce à différents acteurs moléculaires exprimés par l'astrocyte, ce dernier joue un rôle important dans la régulation de la concentration de différents ions dans le milieu extracellulaire. Sans vouloir être exhaustif, nous présenterons ici les principales fonctions homéostatiques ioniques.

La concentration en potassium est d'environ 130 mM pour le compartiment intracellulaire, contre environ 3 mM dans le milieu interstitiel. Ce gradient est primordial pour la repolarisation de la membrane neuronale à la suite d'un potentiel d'action. En effet, il a été montré qu'un potentiel d'action unique entraîne une augmentation locale de la concentration extracellulaire en K^+ d'environ 1 mM lors de la repolarisation membranaire (Ransom, Ransom and Sontheimer 2000). Au niveau post-synaptique également, le fonctionnement des récepteurs ionotropiques s'accompagne d'une sortie de K^+ , notamment au niveau des récepteurs NMDA (Shih *et al.* 2013). De la même manière, l'activité des transporteurs du glutamate est associée à un efflux d'ions potassiques. L'activité neuronale contribue ainsi à augmenter la concentration extracellulaire en potassium. Il paraît donc essentiel de disposer de mécanismes permettant de faire diminuer cette concentration afin de maintenir le gradient de concentration et de permettre la continuité de la transmission neuronale rapide. L'astrocyte intervient dans ce processus grâce à une action de « tamponnement spatial » (Wallraff *et al.* 2006). Dans un premier temps, des canaux potassiques de type K_{ir} (*potassium inward rectifying*) astrocytaires vont être activés et

remédier rapidement à l'augmentation locale d'ion K^+ extracellulaire. Dans un deuxième temps, la concentration intracellulaire de K^+ va être uniformisée en redistribuant les ions K^+ à travers le réseau astrocytaire *via* les jonctions communicantes (Wallraff *et al.* 2006). Par ailleurs, il est intéressant de noter que les canaux de type $K_{ir}4.1$ sont les canaux potassiques les plus exprimés par les astrocytes notamment au niveau des prolongements péri-synaptiques (Nwaobi *et al.* 2016). Leur activité a d'ailleurs été décrite comme essentielle dans la recapture du glutamate puisque les transporteurs impliqués dans ce mécanisme requièrent une sortie de K^+ (Kucheryavykh *et al.* 2007).

En parallèle de l'efflux de potassium, l'activité synaptique est associée à un important influx de calcium, autant au niveau pré-synaptique que post-synaptique. Or il a été montré qu'une diminution de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} induisait une augmentation de la concentration cytosolique au sein des astrocytes *via* une libération massive à partir des stocks internes (Zanotti and Charles 1997). Cette augmentation de Ca^{2+} intra-astrocytaire va permettre de compenser la diminution extracellulaire en Ca^{2+} en libérant du calcium grâce à des pompes calciques ou à l'échangeur sodium calcium (NCX) (Verkhratsky and Nedergaard 2018). Nous reviendrons plus en détails sur la signalisation calcique astrocytaire ultérieurement.

Parmi les rôles essentiels en rapport avec l'homéostasie ionique, nous pouvons également citer la régulation du pH. L'exocytose de différents types de molécules *via* la fusion de vésicules est à la base de la communication intercellulaire et notamment celle de la transmission synaptique. Or nous savons que la lumière des vésicules est un compartiment acide (pH $\sim 5.2 - 5.7$) (Miesenböck, De Angelis and Rothman 1998). Leur fusion à la membrane a donc pour conséquence une augmentation extracellulaire de la concentration en ion H^+ et donc une acidification du milieu. Les astrocytes contrebalancent ce processus grâce à deux mécanismes principaux. Le premier correspond au fonctionnement du co-transporteur sodium-bicarbonate (NBC) permettant la libération d'ions HCO_3^- qui vont tamponner le milieu en se liant aux ions H^+ présents. Le deuxième concerne les transporteurs GLAST et GLT-1 impliqués dans la recapture du glutamate, puisque leur fonctionnement implique un co-transport d'ion H^+ vers le milieu intracellulaire (pour revue voir Deitmer and Rose 2009).

Les mouvements ioniques entre différents compartiments s'accompagnent nécessairement de mouvements d'eau dans un souci de maintien de l'osmolarité. Au niveau moléculaire, ce rôle est majoritairement assuré par les aquaporines. Il s'agit de protéines membranaires qui forment des pores au niveau de la membrane uniquement perméables aux molécules d' H_2O , dont l'ouverture est régie par la pression osmotique. Au sein du cerveau la forme prédominante

correspond à l'aquaporine-4 (AQP4) et son expression est majoritairement astrocytaire. Il a d'ailleurs été montré que l'expression de AQP4 colocalise étroitement avec l'expression de $K_{ir}4.1$ sous-tendant un effet synergique dans le maintien de l'osmolarité (Amiry-moghaddam and Ottersen 2003). De plus, l'organisation des astrocytes en réseau via des jonctions communicantes permet un équilibre extrêmement facilité et rapide de l'osmolarité localement. Cela semble donc confirmer le rôle central des astrocytes dans l'homéostasie ionique et aqueuse au sein du SNC. Par ailleurs, les travaux de Haj-yasein et al. 2012, ont permis de montrer que l'AQP4 astrocytaire joue un rôle essentiel dans le contrôle du volume de l'espace extracellulaire et nous verrons par la suite que son activité est également associée au système glymphatique.

2. Barrière hémato-encéphalique et contrôle du flux sanguin

Afin de protéger le SNC d'éventuels agents pathogènes ou d'éventuelles toxines présents dans l'organisme, celui-ci est isolé de la circulation sanguine par une barrière composée de différents types cellulaires appelée barrière hémato-encéphalique (BHE). Les astrocytes ont la particularité de projeter des prolongements, appelés pieds astrocytaires, qui viennent au contact des vaisseaux sanguins et interagissent avec les cellules endothéliales, ce qui permet de définir l'astrocyte comme l'un des acteurs majeurs de la BHE.

Ce rôle intervient dès le développement embryonnaire puisque l'astrocyte sécrète des facteurs angiogéniques comme le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ou l'angiopoïétine 1 (Ang1) qui vont permettre la mise en place du système vasculaire au sein du SNC (Daneman and Prat 2015). Ils peuvent également sécréter des protéines impliquées dans la voie de signalisation de *Hedgehog*. Cette voie de signalisation, qui intervient à la fois pendant le développement et au sein d'un cerveau mature, permet l'expression des protéines de jonction qui vont constituer les jonctions serrées, à l'origine du phénotype endothélial de la BHE et de la réduction la perméabilité de la BHE (Alvarez *et al.* 2011). Parmi les autres facteurs qui influencent la perméabilité et qui sont libérés par l'astrocyte, on retrouve également TGF- β , une cytokine qui va également contribuer à réduire la perméabilité de la BHE (Daneman and Prat 2015).

Le contact des pieds astrocytaires avec les vaisseaux sanguins permettent également aux astrocytes d'interagir avec les cellules musculaires lisses qui forment la paroi externe des vaisseaux et donc de moduler le flux sanguin (pour revue voir Attwell *et al.* 2010). Comme nous le verrons par la suite, cette propriété des astrocytes est étroitement liée au rôle de support

du métabolisme énergétique des neurones. Il a ainsi été mis en évidence qu'en réponse aux neurotransmetteurs libérés lors de l'activité synaptique, les astrocytes mettent en jeu différentes voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} qui vont contribuer à la libération soit de facteur vasodilatateurs soit vasoconstricteurs permettant de contrôler le débit sanguin (Verkhratsky and Nedergaard 2018). Il est intéressant de noter que la modification de la perfusion des tissus est à la base de l'IRM cérébrale fonctionnelle. En effet, cette technique de neuroimagerie repose sur la détection du signal BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) correspondant à l'augmentation de l'oxygénation des zones actives du cerveau *via* une augmentation du flux sanguin. Il semble donc que ce type d'imagerie met également en évidence l'activité astrocytaire associée à la modification du flux sanguin.

3. Système glymphatique

Le fonctionnement cellulaire implique la production de déchets métaboliques. Dans tous les tissus périphériques, c'est le système lymphatique qui est en charge d'évacuer ces déchets et de réguler le volume du milieu extracellulaire en drainant l'excès de fluide. Cette fonction est assurée par les capillaires lymphatiques (Swartz 2001). Du fait de l'isolement du SNC de la circulation systémique *via* la BHE, il n'existe pas de système lymphatique au sein du SNC à proprement parler. Or, le cerveau est un organe extrêmement actif métaboliquement, on estime qu'il consomme environ 20 % de l'énergie disponible dans l'organisme au repos (Attwell and Laughlin 2001) et produit par conséquent une grande quantité de déchets métaboliques. Cette fonction de nettoyage du SNC est assurée par l'astrocyte, on parle alors de système glymphatique (Iliff *et al.* 2012). Ce rôle est permis grâce aux pieds astrocytaires qui enrobent les vaisseaux sanguins et grâce au fort niveau d'expression de l'AQP4 par les astrocytes, notamment au niveau des pieds astrocytaires (Amiry-moghaddam and Ottersen 2003). Le fonctionnement de ce système repose sur un flux convectif du liquide interstitiel généré par les astrocytes grâce à un influx d'eau au niveau péri-artériel et un efflux au niveau péri-veineux *via* les AQP4 (**Figure 17**) (Nedergaard 2013). De manière intéressante, il semblerait que la position allongée au cours du sommeil augmente la capacité du système glymphatique à éliminer les déchets métaboliques qui sont produits majoritairement au cours de l'état éveillé (Lee *et al.* 2015). Il est intéressant de noter qu'une étude a montré que 65 % du peptide A β cérébral est éliminé par le système glymphatique (Iliff *et al.* 2012) et par conséquent la position allongée associée au sommeil constitue la voie privilégiée de clairance d'A β (Lee *et al.* 2015). Or, une expression altérée de l'AQP4 a été décrite au sein des astrocytes situés à proximité des plaques dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hoshi *et al.* 2012). De plus, la

délétion de l'AQP4 chez un modèle murin APP/PS1 exacerbe l'accumulation d'A β et les déficits mnésiques (Xu *et al.* 2015). Ces études suggèrent donc qu'un important manque de sommeil ou qu'un déficit fonctionnel des astrocytes au sein de ce système glymphatique pourrait expliquer l'accumulation d'A β au sein du SNC dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

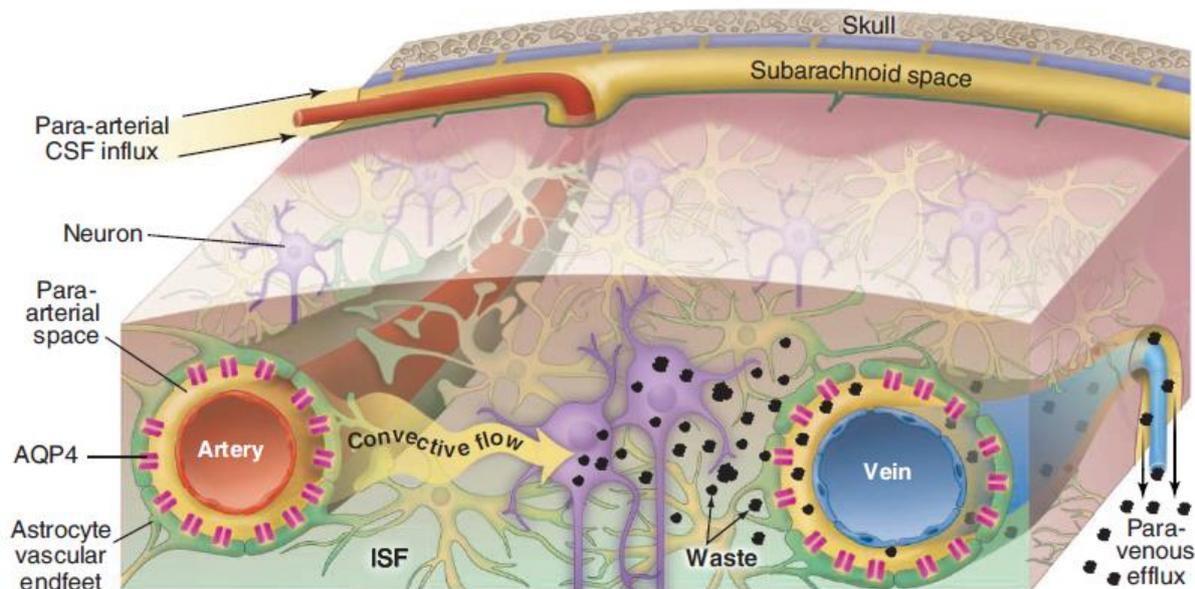


Figure 17 : Schéma du fonctionnement du système glymphatique. Un flux convectif du liquide interstitiel (ISF) est généré par les astrocytes grâce à un influx d'eau péri-artériels et un efflux péri-veineux *via* les aquaporines 4 (AQP4). Ce flux participe à la clairance des déchets métaboliques produits au sein du SNC. (Adapté de Nedergaard 2013).

4. Réaction inflammatoire

En plus de leurs rôles dans le fonctionnement physiologique, les astrocytes jouent un rôle important dans le cadre d'éventuels dommages ou dans le contexte de certaines pathologies pouvant survenir au sein du SNC, à travers un processus inflammatoire appelé astroglie. Ce terme assez généraliste regroupe un ensemble de changements concernant à la fois l'expression génique, la morphologie cellulaire et la physiologie de l'astrocyte qui diffèrent selon la nature et la sévérité des dommages (Sofroniew 2014). Parmi les caractéristiques principales de cette inflammation astrocytaire, on note une hypertrophie cellulaire accompagnée d'une augmentation d'expression des protéines des filaments intermédiaires comme la GFAP ou encore la vimentine. Il est important de mentionner que ce processus ne survient pas de manière isolée mais intervient dans un contexte où l'homéostasie du SNC est altérée, ce qui entraîne une modification de la signalisation inter-cellulaire qui ne met pas seulement en jeu les astrocytes (Burda and Sofroniew 2014). L'astroglie se met donc en place en réponse à la présence de

différents signaux pro-inflammatoires, c'est pour cela qu'on parle également d'astrocytes réactifs.

Les astrocytes réactifs ont démontré la capacité de mettre en place une réponse soit pro-inflammatoire, soit anti-inflammatoire. La nature bénéfique ou délétère de ce processus fait encore aujourd'hui l'objet d'un débat soutenu. Plusieurs expériences ont montré que le blocage ou la prévention de l'astrogliose dans différents modèles de troubles du SNC était un facteur d'aggravation, laissant penser à un rôle bénéfique de ce processus (Sofroniew 2005). A l'inverse, cibler les astrocytes réactifs semble constituer une approche thérapeutique intéressante dans plusieurs pathologies du SNC (Hamby and Sofroniew 2010). Dans le but de concilier ces observations, une des hypothèses propose de classer l'astrogliose selon un gradient de sévérité qui serait un processus adaptatif en fonction de l'ampleur de l'inflammation ou de la lésion (**Figure 18**) (Sofroniew 2014). Ainsi, dans le cas d'une astrogliose modérée les astrocytes rempliraient un rôle plutôt anti-inflammatoire et dans le cas où l'inflammation serait trop importante les astrocytes basculeraient vers une astrogliose sévère avec une signalisation pro-inflammatoire dans le but de former une cicatrice gliale afin d'empêcher radicalement la

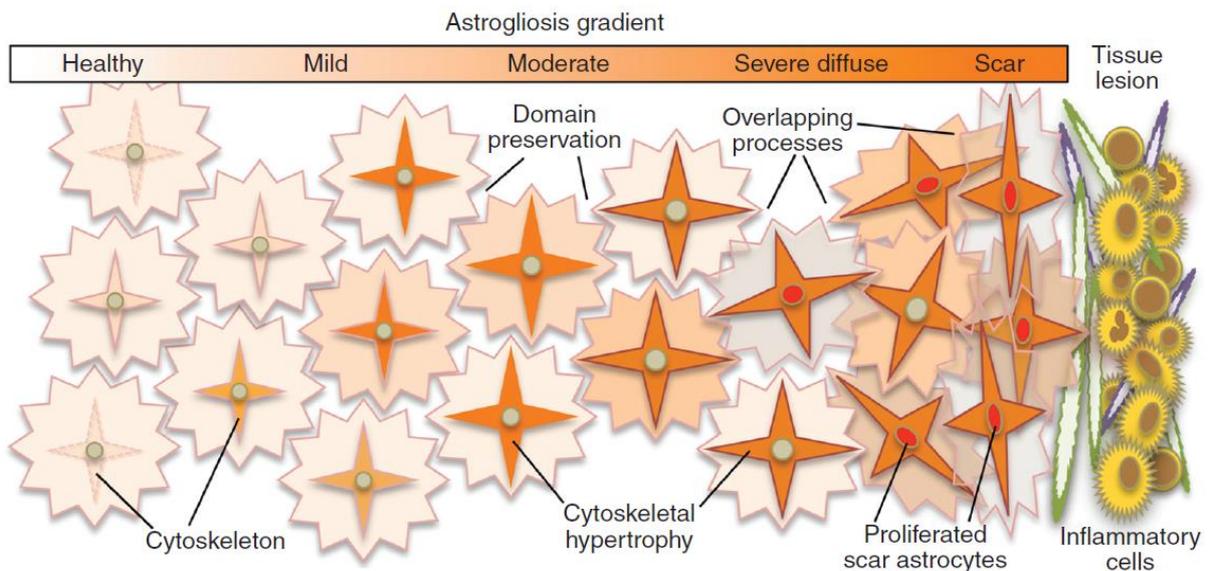


Figure 18 : Schéma représentant le gradient de l'astrogliose, allant de légère à sévère jusqu'à la cicatrice gliale. Dans le tissu sain du SNC, de nombreux astrocytes n'expriment pas des niveaux détectables de la protéine cytosquelettique GFAP. Dans l'astrogliose légère à modérée, la plupart des astrocytes augmentent le niveau de GFAP et hypertrophient leur cytosquelette tout en préservant les territoires individuels. Dans les cas sévères d'astrogliose diffuse, il y a en plus prolifération des astrocytes (représentée par des noyaux rouges). Les cicatrices astrogliales compactes sont composées des astrocytes qui ont proliféré avec des prolongements se chevauchant de manière dense pour former des frontières avec les tissus endommagés et l'inflammation. (Adapté de Sofroniew 2014).

propagation de l'inflammation. Les astrocytes tireraient donc parti de leur organisation en réseau interconnecté pour fournir une réponse adaptée rapide à la suite d'un trouble survenu au sein du SNC. Cette vision vient appuyer le concept d'astrocytopathies, où on imagine qu'une réponse mal adaptée des astrocytes à des signaux d'inflammation puisse être la cause d'une altération de l'homéostasie du SNC et être à l'origine d'un processus neurodégénératif par exemple (Verkhratsky *et al.* 2012).

Une autre hypothèse permettant d'expliquer cette dualité entre rôle protecteur et rôle délétère, propose de distinguer deux sous-populations d'astrocytes réactifs, nommées A1 et A2, mis en évidence par analyses transcriptomiques (pour revue voir Liddelow and Barres 2017). Les astrocytes de type A1, observés dans un contexte de neuroinflammation, présentent une expression augmentée pour plusieurs gènes dont notamment des gènes codant pour le système du complément. La libération par l'astrocyte, de protéines appartenant à ce système, comme C1q ou C3, a été décrite comme responsable de l'élimination des synapses et semble impliquée dans différents contextes neurodégénératifs (Stevens *et al.* 2007). De plus, le phénotype astrocytaire A1 semble être induit par la microglie activée et être associé à un rôle neurotoxique (Liddelow *et al.* 2017). A l'inverse, le type A2, identifiée en premier lieu dans un contexte d'ischémie cérébrale, présente une augmentation de la production de facteurs neurotrophiques impliqués dans la survie neuronale et de thrombospondines impliquées dans la formation de synapses (Zamanian *et al.* 2012). Ce deuxième type d'astrocytes réactifs semble donc plutôt impliqué dans un rôle bénéfique. Le point de vue proposé par Liddelow et Barres dans la publication de 2017 s'accorde avec la vision du Dr Sofroniew, en expliquant que ces deux types d'astrocytes réactifs pourraient correspondre aux deux extrémités d'un spectre déclinant une population hétérogène d'astrocytes réactifs dont le phénotype est induit par la nature et la gravité de la perturbation.

C. Interactions neurones-astrocytes

Parmi les rôles essentiels que l'astrocyte remplit au sein du SNC, on retrouve ceux associés à la régulation de l'activité neuronale. Les interactions neurones-astrocytes sont primordiales et en même temps complexes puisqu'elles se distinguent par différents niveaux d'interaction comme nous allons le voir dans cette partie.

1. Contrôle du métabolisme énergétique

Nous avons vu précédemment que le SNC est isolé de la circulation systémique par la BHE. Pourtant on estime que le cerveau consomme environ 20 % de l'énergie de l'organisme au

repos. Au sein de ces 20 %, ce sont les neurones qui sont les plus demandeurs avec notamment 47 % d'énergie requise pour les potentiels d'action et 34 % pour les potentiels post-synaptiques (Attwell and Laughlin 2001). Ce sont les astrocytes, en faisant contact avec les vaisseaux et en modulant le flux sanguin en fonction des besoins énergétiques des différentes structures, qui constituent la porte d'entrée des substrats énergétiques nécessaires à l'activité neuronale. Le rôle de support métabolique aux neurones assuré par les astrocytes met en jeu plusieurs voies de signalisation complexes. Dans le contexte de ce travail de thèse, il paraissait intéressant de présenter celle mettant en jeu le lactate couramment appelée *astrocyte-neuron lactate shuttle* (ANLS) (**Figure 19**), puisqu'elle est couplée au transport du glutamate dont l'expression et l'activité sont altérées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette voie vise à pallier les importantes dépenses énergétiques associées au fonctionnement des synapses excitatrices glutamatergiques. Nous avons vu brièvement que les astrocytes étaient responsables en majeure partie de la recapture du glutamate. Le fonctionnement des transporteurs implique une entrée de Na^+ et une sortie de K^+ . Le retour à l'équilibre ionique est assuré par des pompes sodium-potassium qui nécessitent la consommation d'ATP. Les astrocytes puisent donc du glucose dans la circulation sanguine et fournissent l'ATP nécessaire au fonctionnement des pompes Na^+/K^+ via une glycolyse anaérobie qui permet de produire du pyruvate. Ce dernier est transformé en lactate qui est transporté au sein des neurones, où il sera transformé de nouveau en pyruvate pour servir de substrat à la glycolyse aérobie permettant la production d'ATP nécessaire au fonctionnement de la synapse (pour revue voir Bélanger, Allaman and Magistretti 2011). L'ensemble de ce processus est appelé couplage neurométabolique car il associe la détection de l'activité neuronale par l'astrocyte (via la mise en jeu des transporteurs du glutamate) au transport du glucose, à la stimulation de la glycolyse et au transfert du lactate vers les neurones (Magistretti *et al.* 1999).

Il est intéressant d'ajouter qu'il existe une alternative à l'import du glucose à partir de la circulation sanguine. En effet, au sein du SNC il existe des stocks de glycogène, retrouvés principalement au sein des astrocytes, permettant de produire du glucose par glycogénolyse en cas de besoin énergétique accru ou de taux sanguin insuffisant (Brown 2004). Plusieurs observations indiquent que les stocks de glycogènes sont formés pendant le sommeil et il a été montré que la glycogénolyse joue un rôle important dans les mécanismes de mémoire à long terme (Gibbs, Anderson and Hertz 2006; Suzuki *et al.* 2011).

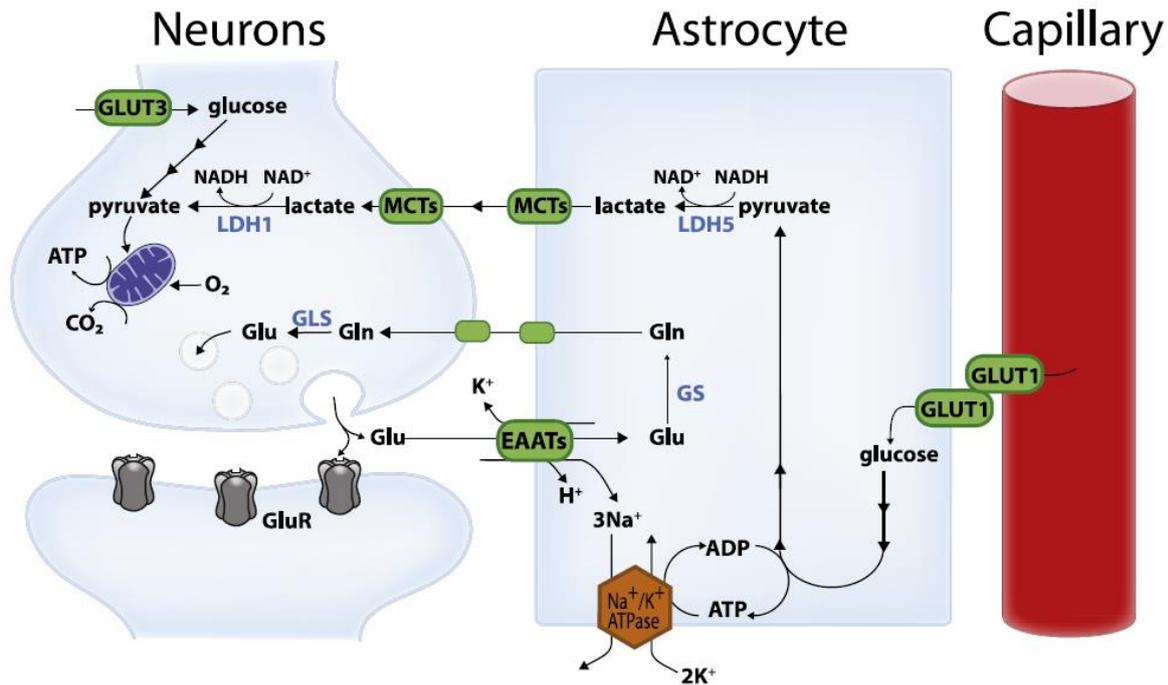


Figure 19 : Représentation schématique de la voie *astrocyte-neuron lactate shuttle* (ANLS). Le mécanisme de libération du glutamate (Glu) au niveau de la synapse qui active les récepteurs glutamatergiques (GluR) est associé à d'importantes dépenses énergétiques. Une grande partie du glutamate libéré à la synapse est capté par les astrocytes via des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT, plus spécifiquement GLT-1 et GLAST) avec un symport de 3 ions Na^+ , ce qui permet le recyclage du glutamate *via* le cycle glutamate - glutamine (Gln). Ce Na^+ est extrudé par l'action de l'ATPase Na^+/K^+ , consommant de l'ATP. Cela déclenche une glycolyse anaérobie dans les astrocytes et requiert l'absorption du glucose de la circulation sanguine à travers le transporteur de glucose GLUT1, exprimée à la fois par les cellules endothéliales et les astrocytes. Le pyruvate généré par la glycolyse est converti en lactate par la lactate déshydrogénase 5 (LDH5 ; principalement exprimée par les astrocytes). Le lactate est transporté vers les neurones par des transporteurs de monocarboxylates (principalement MCT1 et MCT4 dans les astrocytes et MCT2 dans les neurones). Dans les neurones, ce lactate peut être utilisé comme substrat énergétique après sa conversion en pyruvate (Pyr) par LDH1 (principalement exprimé dans les neurones). Les neurones peuvent également directement absorber le glucose via le transporteur neuronal du glucose 3 (GLUT3). GS, glutamine synthétase ; GLS, glutaminases. (Adapté de Bélanger et al. 2011).

2. Régulation de la connectivité synaptique

Tout au long de la vie, les connections synaptiques font l'objet d'une régulation dynamique qui peut être décrite en trois principales étapes. Dans un premier temps, il y a l'étape de synaptogenèse qui correspond à la formation de l'interaction synaptique entre la terminaison axonale et l'élément post-synaptique. Dans un second temps, il y a une étape de stabilisation et de maturation. Enfin, dans un dernier temps, les synapses superflues pourront faire l'objet d'une élimination ciblée. Cette dynamique synaptique est à la base de la neuroplasticité nécessaire

aux processus d'apprentissage et de mémorisation (Choquet and Triller 2013). Nous allons voir dans cette partie que les astrocytes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la connectivité synaptique.

a. Synaptogenèse

Une des caractéristiques du développement embryonnaire, est que l'astrocytogenèse a lieu après la neurogenèse (Miller and Gauthier 2007). Cette temporalité fait l'objet d'une exception au sein des structures où l'on observe une neurogenèse à l'âge adulte, comme l'hippocampe, où les astrocytes participent à la génération des nouveaux neurones et à leur intégration dans le circuit neuronal existant (Sultan *et al.* 2015). Partout ailleurs, les astrocytes ne participent pas à cette intégration, cependant, il est intéressant de noter que la principale « vague » de formation des synapses intervient après l'astrocytogenèse (Miller and Gauthier 2007). Cette observation sous-entend une intervention astrocytaire dans la mise en place des synapses. Les premières évidences de ce rôle sont venues d'expériences *in vitro* qui ont montré que l'addition d'astrocytes à des cultures de neurones permet d'augmenter d'environ 7 fois le nombre de synapses par rapport à des cultures de neurones seuls (Pfrieger and Barres 1997). Par ailleurs, cette étude a montré que les synapses présentes dans les cultures de neurones seuls sont très peu fonctionnelles. Par la suite, le contrôle de la synaptogenèse par les astrocytes a été confirmé par diverses études (Eroglu and Barres 2010) et un grand nombre de facteurs sécrétés par les astrocytes ont été impliqués dans la formation des synapses. Dans le cas de la mise en place des synapses excitatrices nous pouvons citer la protéine hevin (Kucukdereli *et al.* 2011; Singh *et al.* 2016) et les thrombospondines (Christopherson *et al.* 2005) qui vont être responsables de la formation structurale des synapses et de la mise en route de l'activité pré-synaptique. Nous pouvons également mentionner le cholestérol, qui a été le premier produit de sécrétion astrocytaire identifié comme jouant un rôle dans la synaptogenèse, notamment en augmentant le nombre de vésicules pré-synaptiques et la probabilité de libération de neuro-transmetteurs (Mauch *et al.* 2001). Dans le cadre de ce travail de thèse, il est intéressant de rappeler ici que le métabolisme du cholestérol au sein du SNC est étroitement lié à la protéine ApoE qui est majoritairement produite par les astrocytes et dont l'allèle $\epsilon 4$ constitue le principal facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer (Mahley 2016). Lors de cette première étape, les synapses nouvellement formées sont silencieuses car elles contiennent majoritairement des récepteurs NMDA et peu de récepteurs AMPA pour permettre une dépolarisation suffisante de l'élément post-synaptique. L'étape de maturation permettra à ces synapses de devenir fonctionnelles.

b. Stabilisation et maturation

Il a été mis en évidence, notamment grâce à la microscopie électronique que les synapses pouvaient faire l'objet d'un enrobage par un prolongement astrocytaire (Ventura and Harris 1999), nommé alors *perisynaptic astrocytic process* (PAP) (**Figure 20**). Cet enrobage a une fonction de stabilisation structurale de la jonction synaptique. Comme nous l'avons vu précédemment, un territoire astrocytaire occupe un espace au sein duquel se trouvent jusqu'à 120 000 synapses (Halassa *et al.* 2007). On estime ainsi que la moitié des synapses du SNC font l'objet d'un enrobage par un PAP, avec un pourcentage qui varie d'une structure à l'autre et qui se situe entre 60 et 90% des synapses dans le cas de l'hippocampe chez le rat (Witcher, Kirov and Harris 2007). Par ailleurs, les PAPs représenteraient 80 % de la surface membranaire des astrocytes (Reichenbach, Derouiche and Kirchhoff 2010). De plus, il a été constaté au sein de l'hippocampe qu'environ 90% des synapses enrobées correspondent à des synapses matures de type « mushroom », ce qui suggère un lien entre les astrocytes et la maturation des synapses (Witcher, Kirov and Harris 2007).

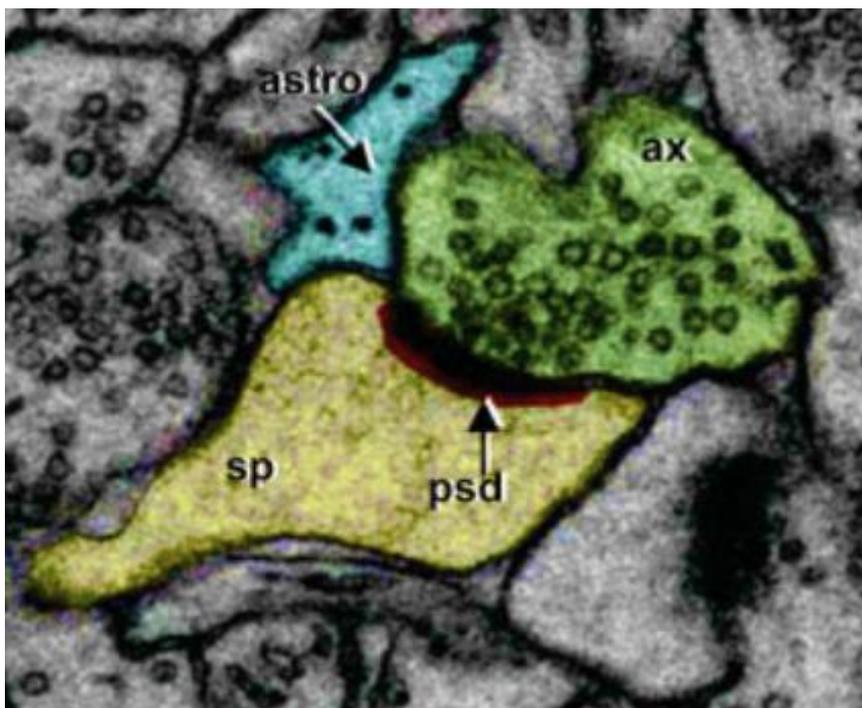


Figure 20 : Prolongement astrocytaire au contact de la synapse. Coupe de microscopie électronique montrant une synapse au sein de l'hippocampe avec la terminaison axonale (vert), l'épine dendritique (jaune), la densité post-synaptique (rouge) et le prolongement astrocytaire au contact des éléments pré- et post-synaptiques (bleu). (Adapté de Witcher *et al.* 2007).

La maturation dans le cas des synapses excitatrices glutamatergiques se caractérise principalement par le recrutement de récepteurs AMPA au niveau de la membrane post-synaptique pour permettre une dépolarisation membranaire suffisante afin d'activer les récepteurs NMDA et rendre la synapse pleinement fonctionnelle. L'intérêt de ne pas former directement des synapses matures et de passer par une étape de maturation est de pouvoir potentialiser rapidement la réponse synaptique d'un neurone en cas de besoin ; par la mise en

fonction de synapses déjà formées, sans passer par les étapes de mise en place structurale de la synapse. La maturation synaptique constitue ainsi un mécanisme de plasticité neuronale (Baldwin and Eroglu 2018). Il a ainsi été montré qu'au cours du développement les astrocytes sécrètent les facteurs glypican 4 (Gpc4, enrichi au niveau de l'hippocampe) et glypican 6 (Gpc6, enrichi au niveau du cervelet) qui vont promouvoir le recrutement synaptique des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA1 (Allen *et al.* 2012). Cependant, la sous-unité GluA1 est perméable au calcium et est exprimée uniquement pendant le développement. Pour que la maturation synaptique soit complète ou qu'elle s'opère dans un cerveau adulte, il est nécessaire d'opérer un recrutement de récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluA2. Là encore, les astrocytes sont impliqués dans ce processus avec la libération de Chordin-like 1 (Chrdl1) qui va permettre le recrutement de ces nouveaux récepteurs AMPA et la maturation fonctionnelle complète des synapses (Blanco-suarez *et al.* 2018).

Il est important de préciser que l'enrobage synaptique par les astrocytes est un processus hautement dynamique. Il a notamment été observé qu'au cours du sommeil l'enrobage diminue, sans doute pour permettre la détoxification par le système glymphatique comme nous l'avons vu précédemment, alors qu'au cours de l'état de veille il augmente dans le but probable d'assurer le bon fonctionnement des synapses les plus sollicitées (Bellei *et al.* 2015). De plus, des travaux publiés en 2014 ont montré *ex vivo* que la LTP dans l'hippocampe induisait une augmentation de la motilité des PAPs avec une augmentation de l'enrobage et de la stabilité synaptique (Bernardinelli *et al.* 2014). Cette étude a ainsi permis d'identifier un rôle structural des astrocytes dans la plasticité synaptique.

c. Elimination

Au cours du développement, et de manière générale tout au long de la vie, il est important que le SNC ait la capacité d'éliminer les synapses superflues. Les astrocytes interviennent également dans ce mécanisme de manière directe et indirecte. Ils peuvent ainsi directement phagocyter les synapses grâce à l'activation des récepteurs de phagocytose spécifiquement astrocytaires MERTK et MEGF10 (Chung *et al.* 2013). Les astrocytes peuvent également « taguer » les synapses à éliminer en libérant la cytokine pro-inflammatoire TGF- β qui va induire une augmentation d'expression de la protéine du système du complément C1q au niveau des membranes neuronales synaptiques (Bialas and Stevens 2013). C1q est plus exactement un complexe protéique membranaire, reconnue par les cellules microgliales et qui va entraîner la phagocytose des synapses par ces dernières.

3. Synapse tripartite

Au-delà du rôle de stabilisation et de support structural exercé par l'enrobage de la synapse par l'astrocyte, il s'avère que cette proximité physique fait également l'objet d'une interaction fonctionnelle complexe bidirectionnelle qui a pour conséquence la modulation de la transmission synaptique. Ces observations ont donné lieu au concept de synapse tripartite, définissant ainsi l'astrocyte comme un acteur de l'activité synaptique (Araque *et al.* 1999). Dans cette partie, nous allons voir les principales caractéristiques de cette interaction fonctionnelle.

a. Homéostasie des neurotransmetteurs

Précédemment dans cette introduction, nous avons évoqué le fait que la membrane astrocytaire se trouvant à proximité des synapses est impliquée dans la recapture des neurotransmetteurs libérés au niveau de la fente synaptique. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des synapses glutamatergiques où il a été estimé que le glutamate, libéré au sein de la fente synaptique, avait la possibilité de rencontrer 7000 transporteurs contre 25 récepteurs AMPA sur une distance de diffusion de 0,5 μm (Marcaggi and Attwell 2004). Ainsi, il a été estimé que 80 % du glutamate présent au niveau de la synapse est recapté par les astrocytes (Danbolt 2001). Les transporteurs impliqués dans la recapture et exprimés par les astrocytes sont des transporteurs de haute affinité nommés *excitatory amino acid transporter* 1 et 2 (EAAT1 et EAAT2) ou respectivement GLAST et GLT-1 dans leur version chez le rongeur. Dans l'hippocampe, EAAT1 et EAAT2 représentent 0,3 et 1,3 % de toutes les protéines présentes avec un niveau d'expression plus fort à proximité des synapses (Lehre and Danbolt 1998), ce qui témoigne du rôle majeur que joue la recapture du glutamate dans l'homéostasie de cette structure. D'ailleurs, la double ablation des gènes (*knock-out*, KO) pour ces transporteurs chez la souris n'est pas viable (Matsugami *et al.* 2006).

Le glutamate recapté est ensuite recyclé par les astrocytes qui le transforment en glutamine non toxique. La glutamine est par la suite transportée vers la terminaison axonale pour reconstituer le stock pré-synaptique de glutamate (**Figure 18**). Cette transformation est assurée par la glutamine-synthétase qui est exprimée exclusivement dans les astrocytes (Norenberg and Martinez-Hernandez 1979). Il a été estimé que 85 % du glutamate recapté est transformé en glutamine et les 15 % restant sont métabolisés par l'astrocyte pour pallier au coût énergétique de ce recyclage glutamatergique (Rothman *et al.* 2011). Cette boucle de recyclage est essentielle puisque les neurones n'ont pas la capacité de produire du glutamate *de novo* (Bak, Schousboe and Waagepetersen 2006). De plus, l'enrobage synaptique par l'astrocyte participe naturellement à l'isolation physique de la synapse en limitant la diffusion des différents

transmetteurs en dehors de la synapse, augmentant ainsi la sélectivité et la compartimentalisation de la transmission synaptique (Verkhratsky and Nedergaard 2018).

Rappelons ici qu'une diminution de l'activité et de l'expression des transporteurs du glutamate a été observée chez l'homme dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Hoshi *et al.* 2018). Une perturbation de la physiologie astrocytaire en lien avec la régulation homéostatique des neurotransmetteurs permettrait ainsi d'expliquer en partie l'hyperactivité neuronale observée lors des phases cellulaires de la maladie et faire le lien avec l'hypothèse excitotoxique.

b. Gliotransmission

Plusieurs études ont montré que l'activité synaptique induit une élévation du niveau de calcium de manière très compartimentée au sein des prolongements astrocytaires, appelés alors microdomaines (Di Castro *et al.* 2011; Panatier *et al.* 2011). Cela s'explique par le fait qu'il existe un grand nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau de la membrane astrocytaire péri-synaptique qui permettent à l'astrocyte de détecter des changements au niveau de l'activité synaptique (Allen and Barres 2009). Cette augmentation de calcium intracellulaire induite par l'activation des récepteurs astrocytaires, donne lieu à une libération de molécules par l'astrocyte qui vont moduler la transmission synaptique en retour, on parle alors de gliotransmission (**Figure 21**).

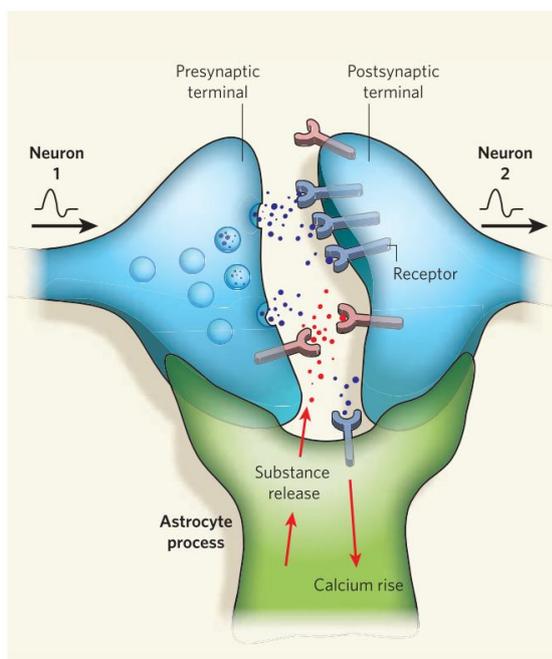


Figure 21 : Schéma représentant le mécanisme de gliotransmission au sein de la synapse tripartite.

L'activation des récepteurs aux neurotransmetteurs, présents au niveau du prolongement astrocytaire péri-synaptique (PAP), donne lieu à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium. L'activité calcique dans les PAPs conduit à une libération de gliotransmetteurs qui permettent à l'astrocyte de moduler la transmission synaptique. (Adapté de Allen et Barres 2009).

Les types de récepteurs exprimés par les astrocytes dépendent du type de synapse. Dans le cas de l'hippocampe, on retrouve des récepteurs à l'acétylcholine (AChR), mais ces derniers sont hautement régionalisés et sont impliqués dans la voie septo-hippocampique (Navarrete *et al.*

2012). Plus généralement, les astrocytes de l'hippocampe expriment un grand nombre de récepteurs du glutamate. Il s'agit essentiellement de récepteurs métabotropiques de type mGluR5, les récepteurs ionotropiques étant très faiblement exprimés (Rose *et al.* 2018). Initialement, il était admis que les mGluR5 étaient présents principalement pendant le développement et au tout début de la vie post-natale, puis son expression diminuait fortement au sein d'un cerveau adulte (Cai, Schools and Kimelberg 2000). Cependant, dans cette étude le séquençage d'ARN est réalisé à partir de l'isolement des astrocytes provenant de tranches d'hippocampe. Cette technique donne des cellules dépourvues de prolongements, laissant penser qu'il s'agit principalement d'un prélèvement du soma des astrocytes. Or mGluR5 est majoritairement présents au niveau des prolongements, ce qui laisse supposer que l'expression astrocytaire de ce récepteurs chez l'adulte est sous-estimée (Pاناتier and Robitaille 2015). Par ailleurs, une étude récente sur l'implication des astrocytes dans l'épilepsie a montré que l'expression de mGluR5 fluctue au cours du temps au sein d'un cerveau adulte et son expression est fortement augmentée dans un contexte d'hyperactivité neuronale (Umpierre *et al.* 2019).

L'activation de mGluR5 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire au sein des prolongements astrocytaires *via* le recrutement de l'inositol-triphosphate (IP₃) et la mise en jeu de stocks internes de calcium (Niswender and Conn 2010). Nous reviendrons plus en détails sur les diverses sources de calcium au sein de l'astrocyte dans la partie sur la signalisation calcique. D'une manière générale, il semble que l'augmentation du calcium intracellulaire induite par l'activation des récepteurs du glutamate est associée à une libération de gliotransmetteurs. Les principaux gliotransmetteurs que l'on retrouve au niveau des synapses glutamatergiques sont le glutamate, l'ATP et la D-sérine (Araque *et al.* 2014). Ces gliotransmetteurs pourront alors se fixer sur des récepteurs pré- ou post-synaptiques et moduler la transmission synaptique, en agissant soit directement sur la quantité de transmetteurs présents au niveau de la fente synaptique soit en modulant spécifiquement l'activité de certains types de récepteurs. Les effets modulateurs de cette gliotransmission sont décrits et résumés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Rôles identifiés des principaux gliotransmetteurs dans diverses zones du cerveau.**(Adapté de Araque et al. 2014)**

Brain Area	Neuromodulation	References
Glutamate		
Hippocampus	Depression of evoked EPSCs and IPSCs	Araque et al., 1998a; Liu et al., 2004
Hippocampus	Frequency increase of miniature PSCs	Araque et al., 1998b; Santello et al., 2011
Hippocampus	Frequency increase of miniature IPSCs	Kang et al., 1998
Hippocampus	Frequency increase of spontaneous EPSCs	Jourdain et al., 2007; Fiacco et al., 2007
Hippocampus	Frequency increase of spontaneous IPSCs	Liu et al., 2004
Hippocampus	Postsynaptic SIC	Araque et al., 1998a; Pasti et al., 2001; Sanzgiri et al., 1999; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Cavalier and Attwell, 2005; Kang et al., 2005; Perea and Araque, 2005; Tian et al., 2005; Fellin et al., 2006; Nestor et al., 2007; Navarrete and Araque, 2010; Shigetomi et al., 2008; Sasaki et al., 2011; Navarrete et al., 2012
Hippocampus	Increase of neuronal excitability	Bezzi et al., 1998
Hippocampus	Heterosynaptic depression	Andersson et al., 2007
Hippocampus	Modulation of LTD	Han et al., 2012
Hippocampus	Modulation of LTP	Navarrete et al., 2012
Hippocampus	Synaptic potentiation	Perea and Araque, 2007; Navarrete and Araque, 2010; Navarrete et al., 2012
Hippocampus	Modulation of action potential	Sasaki et al., 2011
Hippocampus	Modulation of basal synaptic transmission	Bonansco et al., 2011
Hippocampus	Regulation of mEPSC kinetics	Han et al., 2012
Cortex	Postsynaptic SIC	Ding et al., 2007; Gómez-Gonzalo et al., 2010; Navarrete et al., 2012; Chen et al., 2012
Cortex	Modulation of LTD	Min and Nevian, 2012
Ventro basal thalamus	Postsynaptic SIC	Parri et al., 2001; Pirttimaki et al., 2011
Spinal cord dorsal horn	Postsynaptic SIC	Bardoni et al., 2010; Nie et al., 2010
Medial nucleus of the trapezoid body	Postsynaptic SIC	Reyes-Haro et al., 2010
ATP/Adenosine		
Hippocampus	Heterosynaptic depression of EPSCs	Serrano et al., 2006; Zhang et al., 2003; Chen et al., 2012; Pascual et al., 2005
Hippocampus	Modulation of LTP	Pascual et al., 2005; Schmitt et al., 2012; Lee et al., 2010
Hippocampus	Basal synaptic depression	Pascual et al., 2005
Hippocampus	Regulation of basal neurotransmission	Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011
Hippocampus	Depression of evoked EPSCs	Martín et al., 2007
Cortex	Regulation of basal synaptic transmission	Halassa et al., 2009
Cortex	Regulation of cortical slow oscillations	Fellin et al., 2009
Cerebellum	Depression of spontaneous EPSCs	Brockhaus and Deitmer, 2002
Retina	Light-evoked neuronal activity	Newman and Zahs, 1998
Retina	Depression of light-evoked EPSCs	Newman, 2003
Nucleus accumbens	Postsynaptic SIC	D'Ascenzo et al., 2007
Hypothalamic paraventricular nucleus	Increase of EPSC amplitude	Gordon et al., 2005, 2009
Medulla oblongata	Activation of chemoreceptor neurons	Gourine et al., 2010
D-Serine		
Hippocampus	Modulation of LTP	Yang et al., 2003; Henneberger et al., 2010; Zhang et al., 2008
Cortex	Modulation of LTP/LTD	Takata et al., 2011; Fossat et al., 2012
Retina	Potentiation of NMDA receptor transmission	Stevens et al., 2003
Hypothalamic supraoptic	Modulation of LTP/LTD	Panatier et al., 2006

Cependant, à l'image de la morphologie des astrocytes, la gliotransmission est complexe et les mécanismes associés ne sont pas encore pleinement compris, notamment en ce qui concerne la voie de libération de ces gliotransmetteurs. La voie principale de libération pour le glutamate et la D-sérine désigne une exocytose par fusion vésiculaire impliquant les complexes SNARE et donc dépendante du calcium (Araque *et al.* 2000; Bergersen *et al.* 2012). Cependant, il existe d'autres mécanismes permettant la libération de gliotransmetteurs. Il a été observé une libération de glutamate *via* un canal anionique, nommé *Bestrophin 1* (Best-1) (Han *et al.* 2013a). Au sein des astrocytes de l'hippocampe, Best-1 est essentiellement localisé au niveau des microdomaines à proximité des synapses et présente une forte perméabilité au glutamate. Cette libération de glutamate est dépendante d'une augmentation de calcium intracellulaire et semble activer préférentiellement les NMDAR synaptiques et ainsi moduler la transmission synaptique (Park *et al.* 2013). Cette voie a également été mise en évidence dans des libérations de GABA astrocytaires et est associée à une relocalisation somatique dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Jo *et al.* 2014). D'autres mécanismes de libération de gliotransmetteurs sont indépendants du calcium. Par exemple, les hémi-canaux ont été impliqués dans la libération de glutamate (Ye *et al.* 2003) ou de D-sérine (Pan, Chou and Sun 2015) dans le milieu extra-cellulaire. C'est également le cas pour certains transporteurs comme Asc-1 mis en jeu dans la libération de D-sérine (Sason *et al.* 2017) ou l'antiport cystine/glutamate dans le cas du glutamate (Soria *et al.* 2014). Le glutamate peut également être libéré *via* un mécanisme qui n'a pas encore été clairement identifié et qui conduit à l'enregistrement des *Slow Inward Currents* (SICs) (Parri, Gould and Crunelli 2001). Les SICs sont des courants avec une signature électrophysiologique particulière (voir la partie méthodes) associée à l'activation de récepteurs NMDA extra-synaptiques (Pirttimaki, Hall and Parri 2011). Le mécanisme associé à ces courants semble associé à un encodage particulier de l'excitabilité calcique astrocytaire (Shigetomi *et al.* 2008) et ne ferait pas intervenir une exocytose vésiculaire (Gómez-gonzalo *et al.* 2018).

Les mécanismes déclencheurs de la libération des gliotransmetteurs sont également complexes et font l'objet d'une grande diversité. En effet, même si la voie initialement décrite désigne une détection de l'activité synaptique *via* l'activation des mGluR5, la gliotransmission semble pouvoir être déclenchée par d'autres stimuli (Papouin *et al.* 2017a). Entre autres, une libération de gliotransmetteurs a pu être observée à la suite de l'activation des récepteurs purinergiques P2Y1 (Delekate *et al.* 2014), des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1 (Martín *et al.* 2015) ou encore de récepteurs cholinergiques (Papouin *et al.* 2017b). Certains de ces mécanismes de

libération semblent même indépendants de l'activité neuronale, puisque l'enregistrement des SICs peut se faire lorsque les potentiels d'action neuronaux sont bloqués avec de la tétradotoxine (TTX) (Pirttimaki, Hall and Parri 2011). Enfin, une libération de gliotransmetteurs a pu être observée tout simplement dans le cas d'une stimulation mécanique des astrocytes avec une pipette de *patch-clamp* (Araque *et al.* 2000), suggérant l'implication de mécano-senseurs dans les possibilités de déclenchement de la gliotransmission.

Le présent manuscrit soutient donc l'idée que la gliotransmission est un processus physiologique complexe qui confère à l'astrocyte la capacité de moduler de manière importante la transmission synaptique et par conséquent la plasticité et son pendant comportemental (Savtchouk and Volterra 2018). Il est cependant important de mentionner qu'il existe un courant de pensée qui désigne la gliotransmission comme un processus « non physiologique » induit par les conditions d'observation des différentes études publiées à ce sujet (Fiacco and Mccarthy 2018). Cette vision s'appuie principalement sur deux éléments : 1) les approches utilisées pour moduler la dynamique calcique astrocytaire, et donc étudier la gliotransmission, peuvent ne pas être spécifiques des astrocytes ou trop perturbatrices vis-à-vis de l'ensemble de la physiologie astrocytaire et donc générer des modifications de l'activité neuronale indépendamment d'une libération de transmetteurs ; 2) la modulation de la dynamique calcique astrocytaire grâce à deux approches génétiques différentes n'a pas permis de reproduire les modifications de l'activité neuronale ou de la plasticité précédemment observées (Fiacco and Mccarthy 2018). Cependant, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, cette vision a été remise en cause par des travaux récents montrant une induction de plasticité par les astrocytes (Adamsky *et al.* 2018), ce qui constitue un argument fort en faveur du concept de la gliotransmission.

c. Implication des astrocytes dans la plasticité et la mémoire

Nous avons vu précédemment que la plasticité à long terme requiert l'activation des récepteurs NMDA (Lau *et al.* 2009). Les astrocytes étant capable de libérer du glutamate et de la D-sérine (co-agoniste nécessaire à l'activation des NMDAR, **Figure 9**), ils peuvent donc influencer sur la plasticité à long terme comme la LTP ou la LTD (**Tableau 2**).

Il a ainsi été montré que la LTP dans l'hippocampe était dépendante de la libération de D-sérine par les astrocytes (Henneberger *et al.* 2010). Or, la D-sérine semble être spécifiquement libérée par les astrocytes au sein du SNC (Oliet and Mothet 2009; Papouin *et al.* 2017c) ce qui a permis d'établir la nécessité de la gliotransmission dans la plasticité synaptique à long terme dans l'hippocampe. Une étude récente a permis d'aller encore plus loin en montrant que la

stimulation des astrocytes dans l'hippocampe était suffisante pour induire une plasticité synaptique à long terme sans aucune stimulation des afférences neuronales (Adamsky *et al.* 2018). Pour cela, les auteurs ont utilisé des techniques de chemogénétique et d'optogénétique pour induire une augmentation de calcium intracellulaire spécifiquement au sein des astrocytes. Grâce à cette approche ils ont mis en évidence une potentialisation synaptique à long-terme dans l'hippocampe impliquant les récepteurs NMDA et la D-sérine, ainsi qu'une amélioration des performances mnésiques chez ces souris.

Par ailleurs, nous avons également vu que selon la nature et surtout la localisation des récepteurs NMDA mis en jeu (synaptiques *versus* extra-synaptiques), les effets sur la plasticité et la survie cellulaire peuvent être différents (Benarroch 2011). Il a ainsi été mis en évidence que les astrocytes pouvaient spécifiquement cibler les récepteurs NMDA extrasynaptiques et réguler la synchronisation et l'excitabilité neuronale (Angulo *et al.* 2004; Fellin *et al.* 2004). Compte tenu de l'implication des récepteurs NMDA extrasynaptiques dans des mécanismes excitotoxiques et pro-apoptotiques (Sattler *et al.* 2000; Hardingham *et al.* 2002; Léveillé *et al.* 2008), il paraît intéressant d'envisager un rôle de la gliotransmission dans certaines conditions pathologiques.

D. Signalisation calcique astrocytaire

1. Excitabilité calcique

L'ion Ca^{2+} est un second messager ubiquitaire impliqué dans de nombreux mécanismes intracellulaires au sein de toute cellule vivante (Plattner and Verkhratsky 2015). Dans le cas de l'astrocyte, les différents rôles que nous venons de présenter impliquent directement ou indirectement la signalisation calcique (Verkhratsky and Nedergaard 2018). L'omniprésence du calcium dans la physiologie astrocytaire a donné lieu au concept d'excitabilité calcique. Initialement, ce concept a été établi à la suite du développement des sondes calciques fluorescentes et de l'imagerie calcique au début des années 90 qui ont permis de montrer *in vitro* que la stimulation mécanique ou chimique (avec du glutamate entre autres) des astrocytes en culture induisait une augmentation du calcium intracellulaire (Charles *et al.* 1991). De plus, l'activité calcique générée par ces stimulations présentait la particularité de pouvoir se propager au sein du réseau astrocytaire sous forme de « vague » calcique (Cornell-Bell and Finkbeiner 1991), un peu à l'image du potentiel d'action qui se propage le long de l'axone grâce à l'entrée de Na^+ , expliquant ainsi le terme « excitabilité ».

Par la suite, l'excitabilité calcique astrocytaire a été confirmée *ex vivo* et *in vivo* et a été décrite comme faisant l'objet d'un codage spatio-temporel complexe. Cela a été observé récemment par le laboratoire du professeur Andrea Volterra, qui pour la première fois a enregistré l'activité calcique d'un astrocyte en trois dimensions, à la fois sur tranches aiguës de cerveau de souris et dans le cortex d'animaux éveillés (Bindocci *et al.* 2017). Ils ont ainsi confirmé le fait que le soma présente des activités calciques peu fréquentes mais de grande amplitude avec une cinétique plutôt lente, alors que la majorité des activités correspondent à des événements brefs et fréquents localisés au niveau de microdomaines d'environ $1 \mu\text{m}^3$ le long des prolongements fins et au niveau des pieds astrocytaires (**Figure 22**). Rappelons ici que les PAPs représenteraient 80 % de la surface membranaire des astrocytes (Reichenbach, Derouiche and Kirchhoff 2010) et par conséquent l'hypothèse qui prévaut décrit l'activité calcique dans ces microdomaines comme le corrélat de l'interaction entre l'astrocyte et la synapse. Il a ainsi été décrit que les signaux calciques observés dans ces microdomaines surviennent en réponse à une

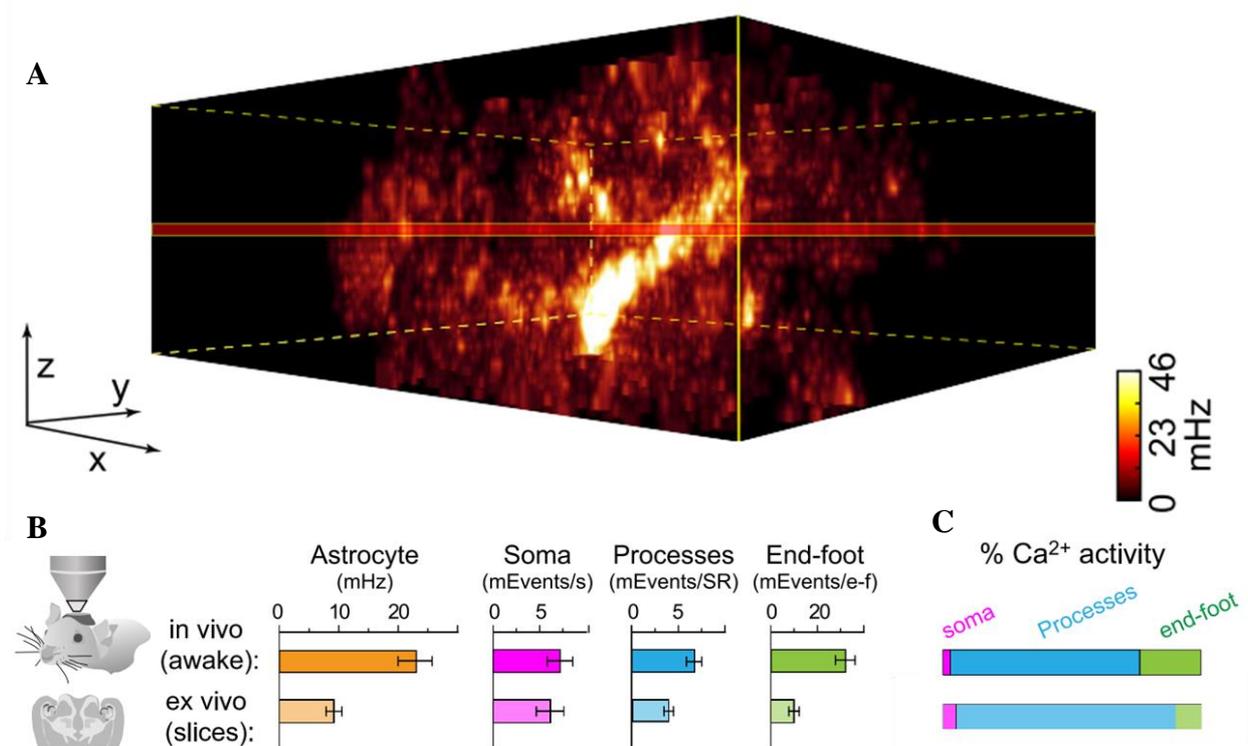


Figure 22 : Activités calciques astrocytaires en 3D. (A) Représentation de la carte des voxels en 3D d'un astrocyte hippocampique *in situ* (VOI = $57 \mu\text{m} \times 44 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$). **(B)** Comparaison de l'activité calcique détectée dans les astrocytes corticaux de souris éveillées (rangée supérieure) et dans les astrocytes hippocampiques de tranches aiguës (rangée inférieure). Les données sont exprimées en fréquences moyennes de voxels actifs dans l'ensemble de l'astrocyte (mHz) ou en fréquences d'événements normalisées dans chaque compartiment (mEvents/s). **(C)** Distribution de l'activité calcique (en pourcentage) parmi le soma, les prolongements et les pieds astrocytaires. (Adapté de Bindocci *et al.* 2017)

stimulation synaptique (Di Castro *et al.* 2011). Cependant, il a également été décrit que l'activité calcique dans ces microdomaines pouvait survenir spontanément, sans lien direct avec l'activité neuronale (Nett, Oloff and McCarthy 2002). Le travail publié par Nett et ses collaborateurs en 2002 est d'ailleurs à l'origine de la technique visant à charger un astrocyte unique avec une sonde fluorescente à l'aide d'une micropipette de *patch-clamp*. Cette technique constitue un élément essentiel du travail présenté dans cette thèse et sera décrite plus en détails dans la partie méthodes. Récemment, l'utilisation de microscopie à haute résolution (*stimulated emission depletion* - STED), a permis de mettre en évidence que les microdomaines actifs en terme d'excitabilité calcique, correspondraient aux PAPs et forment une structure particulière en forme d'anneau qui entoure les synapses (Arizono *et al.* 2020). Les prolongements fins peuvent également faire l'objet d'activités plus étendues (entre 3 et 8 μm) et correspondent à la synchronisation d'activité de plusieurs microdomaines adjacents (Di Castro *et al.* 2011). D'autres évènements calciques particuliers ont été décrits dans les prolongements avec une cinétique plus lentes (plus de 60 s) et ont été nommés *twinkles* ou scintillements calciques (Kanemaru *et al.* 2014). Ces *twinkles* ont été observés uniquement *in vivo* et le rôle physiologique de ces activités n'a pas encore été établi.

Concernant les vagues calciques, elles ont été largement caractérisées *in vitro* et leur étude a permis de mettre en évidence l'importance des jonctions communicantes dans leur propagation. Il a ainsi été mis en évidence que ce n'est pas le Ca^{2+} qui passe directement au travers des jonctions communicantes mais l' IP_3 , qui relaye ainsi la libération massive de calcium à partir des stocks internes d'un astrocyte à l'autre (Höfer, Venance and Giaume 2002). En revanche, *in vivo*, la présence de vagues calciques dans la population astrocytaire n'a été mise en évidence qu'au niveau du cervelet (Hoogland *et al.* 2009). De plus, la fréquence de ces vagues semble augmenter avec l'âge et en contexte d'hypoxie et traduirait donc une réaction du réseau astrocytaire à une mauvaise oxygénation des tissus (Mathiesen *et al.* 2013). Au sein du cortex, l'activité calcique semble être plutôt confinée individuellement dans chaque cellule (Verkhatsky and Nedergaard 2018) et, dans le cas de l'hippocampe, une seule étude a mis en évidence *in vivo* des vagues calciques massives et extrêmement rapides appelées *glissandi* (Kuga *et al.* 2011). Cependant, cette dernière étude a été réalisée sur des animaux fortement anesthésiés à l'uréthane qui est connu, comme d'autres anesthésiants généraux, pour perturber la signalisation calcique astrocytaire (Thrane *et al.* 2012). Par ailleurs, une étude récente a montré que dans un contexte de crise épileptique induite par injection intra-péritonéale de kainate, on observe une synchronisation de l'activité calcique des astrocytes de l'hippocampe

qui précède l'hyperactivité neuronale associée à la crise et qui semble faciliter sa propagation (Heuser *et al.* 2018). Il est intéressant de noter que cette étude utilise également un système d'enregistrement de l'activité calcique des astrocytes *in vivo* avec ablation du cortex, comme dans les travaux de Kuga et ses collaborateurs, mais sur des animaux éveillés. En absence d'injection de kaïnate, aucune activité astrocytaire synchrone n'a été observée, laissant penser que les *glissandi* pourraient être des artéfacts induits par les conditions expérimentales (Verkhratsky and Nedergaard 2018). Ces observations suggèrent donc que les activités calciques mettant en jeu un réseau d'astrocytes de manière synchrone ou sous forme de vague calcique sont plutôt associées à un contexte pathologique.

Les travaux de Henneberger *et al.* en 2010 ont montré que l'excitabilité calcique astrocytaire était nécessaire pour la mise en place de la LTP dans l'hippocampe. Pour cela ils ont utilisé la technique du « *calcium clamp* ». Cette technique consiste à dialyser le milieu intracellulaire du réseau astrocytaire, à l'aide d'une micropipette, avec une solution contenant un chélateur calcique (EGTA) et du chlorure de calcium à une certaine concentration pour bloquer le Ca^{2+} libre dans le cytosol et fixer le niveau de calcium intracellulaire à un niveau bas. Une fois l'excitabilité calcique neutralisée, le protocole d'induction de LTP n'a pas permis de mettre en évidence une potentialisation de la réponse synaptique. Les travaux de Panatier *et al.* en 2011 ont fait appel à une approche similaire en bloquant l'excitabilité calcique du réseau astrocytaire dans l'hippocampe avec du BAPTA, un autre chélateur calcique, et ont montré que la dynamique calcique intracellulaire dans les astrocytes était requise pour la modulation de l'activité synaptique basale. Ces deux études soutiennent donc l'idée que l'excitabilité calcique astrocytaire joue un rôle central dans les interactions entre les astrocytes et les synapses, à la fois dans la modulation de la transmission synaptique mais également dans la mise en place de la plasticité synaptique. Par ailleurs, la mise en jeu de l'excitabilité calcique a été mise en évidence *in vivo* chez l'animal lors de diverses stimulations somato-sensorielles ou lors de tâches motrices (pour revue voir Verkhratsky and Nedergaard 2018), soutenant ainsi davantage l'importance de l'excitabilité calcique dans la physiologie astrocytaire et dans le fonctionnement du SNC.

Même si l'étude des activités calciques astrocytaires semble être pertinente pour avoir des informations sur la physiologie de ces cellules dans diverses conditions, il semble également que l'excitabilité calcique revêt un degré de complexité qui est à l'image des fonctions astrocytaires (pour revue voir Volterra, Liaudet and Savtchouk 2014; Bazargani and Attwell 2016; Shigetomi, Patel and Khakh 2016). Cette complexité s'explique en partie par la diversité

des acteurs moléculaires impliqués dans la signalisation calcique astrocytaire, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

2. Acteurs de la signalisation calcique astrocytaire

a. Vue d'ensemble

Il existe deux sources principales de calcium permettant d'induire une augmentation de la concentration cytosolique au sein de l'astrocyte : le milieu extracellulaire et le réticulum endoplasmique (**Figure 23**). A la surface de la membrane du réticulum, on trouve des récepteurs de la ryanodine (RyR) et des récepteurs de l'IP₃ dont l'ouverture va permettre la sortie de Ca²⁺ du réticulum. L'ouverture des RyR est déclenchée par des concentrations micromolaires de calcium et va conduire à une augmentation de calcium cytosolique (*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*), ce qui les désigne principalement comme un processus d'amplification de la libération de calcium à partir du réticulum (Verkhratsky and Nedergaard 2018). Ils sont faiblement exprimés par les astrocytes et la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique dans ces cellules requiert principalement l'activation de récepteurs canaux de l'IP₃ dont l'isoforme prédominante chez l'astrocyte est l'IP₃R2 (Hertle and Yeckel 2007). Rappelons que l'IP₃ est mis en jeu principalement par l'activation des récepteurs métabotropiques, tels que mGluR5 ou encore les récepteurs purinergiques. De manière intéressante, l'ablation du gène codant pour IP₃R2 chez la souris (IP₃R2-KO) a permis d'observer une disparition presque totale de l'excitabilité calcique spontanée ou évoquée (Petraovicz, Fiacco and McCarthy 2008). Cette observation concerne à la fois les activités calciques somatiques mais également celles observées dans les prolongements fins (Kanemaru *et al.* 2014). Cela a par ailleurs été confirmé par l'injection intracellulaire d'héparine qui est un antagoniste des récepteurs de l'IP₃ (Di Castro *et al.* 2011) et semble confirmer la prédominance de la voie métabotrope dans les mécanismes de perception de l'activité synaptique par les astrocytes avec l'activation du récepteur mGluR5 dont nous avons parlé précédemment. Ces informations ne font pas l'objet d'un consensus car il semblerait qu'il persiste des activités calciques spontanées dans les prolongements fins chez les souris IP₃R2-KO (Srinivasan *et al.* 2015). De plus, les travaux réalisés par Petraovicz *et al.* en 2008 n'indiquent aucune altération de l'activité neuronale spontanée chez les souris IP₃R2-KO, alors que nous avons vu précédemment que le blocage de l'excitabilité calcique affecte la transmission synaptique basale (Panatier *et al.* 2011). Cela suggère donc l'implication d'autres voies de signalisation dans les activités calciques survenant au sein des prolongements mettant en jeu un influx de calcium à travers des acteurs moléculaires membranaires. Le laboratoire du professeur MacVicar a montré que la déplétion de calcium

dans le milieu extracellulaire permet d'abolir presque totalement l'excitabilité calcique astrocytaire dans les prolongements fins, témoignant ainsi du rôle essentiel des canaux membranaires dans ce type d'excitabilité calcique (Rungta *et al.* 2016).

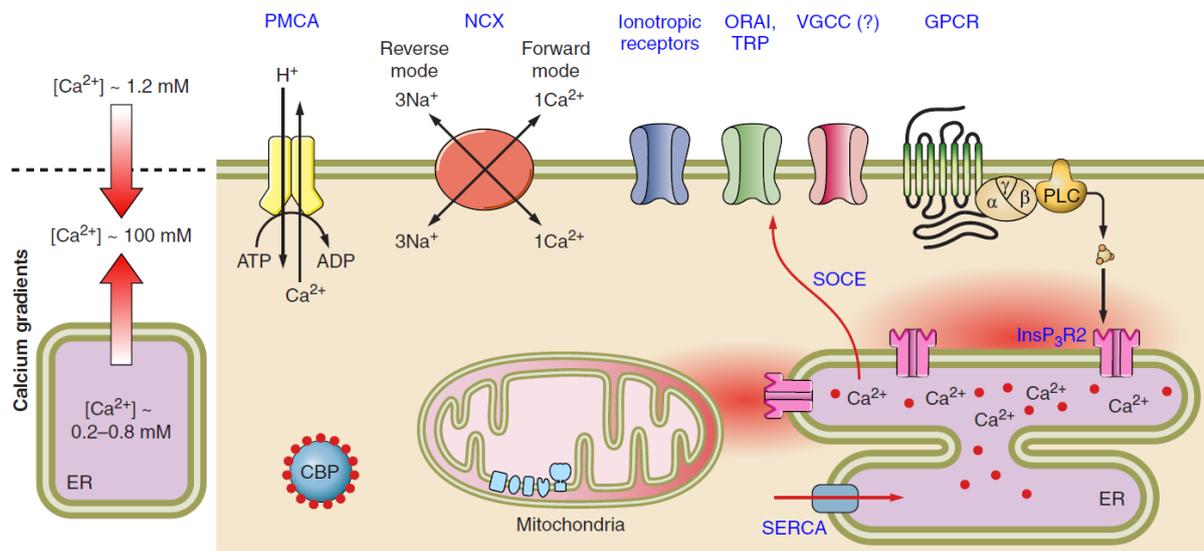


Figure 23 : Principaux acteurs de la signalisation calcique astrocytaire. La signalisation calcique est déterminée par les gradients de concentration des ions Ca^{2+} entre l'espace extracellulaire et le cytosol d'une part et entre la lumière des organelles intracellulaires (principalement le réticulum endoplasmique ER) et le cytosol de l'autre. Au sein de l'astrocyte, le calcium peut provenir d'une part de la libération de Ca^{2+} à partir du réservoir de calcium du réticulum induite par l'InsP3 via l'activation des GPCR (récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G). Il peut également provenir de l'entrée de Ca^{2+} par les canaux transmembranaires (ORAI ; TRP, *transient receptor potential* ; VGCC, *voltage-gated calcium channel*), par les récepteurs ionotropiques ou l'échangeur Na^+ - Ca^{2+} (NCX) en mode inverse. Certains canaux membranaires ont un mode de fonctionnement de type SOCE (*store-operated calcium entry*) et s'activent à la suite de libération de calcium à partir du réticulum. Les signaux calciques se terminent par l'extrusion du Ca^{2+} dans l'espace extracellulaire par les pompes à Ca^{2+} (PMCA) et le NCX en mode normal et par l'absorption du Ca^{2+} dans le RE (par les pompes SERCA) et dans les mitochondries (par l'uniporteur de calcium mitochondrial). L'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries est le principal lien entre l'activité cellulaire et la production d'énergie interne, en régulant le transport des électrons mitochondriaux et la synthèse de l'ATP. InsP3R2, InsP3 récepteur de type 2 ; PMCA, *plasmalemmal Ca²⁺-ATPase* ; RyR, récepteurs de la ryanodine ; SERCA, réticulum sarco(endo)plasmique Ca^{2+} -ATPase. (Adapté de Verkhrasty et Nedergaard 2018).

L'expression et l'implication des acteurs membranaires impliqués dans l'influx de calcium au niveau des prolongements astrocytaires varient entre les différentes structures du cerveau et en fonction du type de synapses associées. Dans le cas de l'hippocampe et des synapses glutamatergiques, comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs ionotropiques de type NMDA sont très faiblement exprimés (Rose *et al.* 2018). Les canaux calciques dépendants du

voltage (VGCC) ont été principalement étudiés *in vitro* mais leur rôle *in vivo* fait débat compte tenu de l'absence de preuves d'implication fonctionnelle de ces canaux (Verkhratsky and Nedergaard 2018). Néanmoins, il a été observé une augmentation de l'expression de ces canaux dans un contexte d'astrogliose (Westenbroek *et al.* 1998). Les canaux de la famille des ORAI fonctionnent sur le principe des *store-operated calcium entry* (SOCE), c'est-à-dire que leur activation nécessite une libération de calcium à partir des stocks internes en premier lieu (Parekh and Putney 2005), ce qui ne peut pas expliquer les activités calciques résiduelles observées chez les souris IP₃R2-KO. L'échangeur sodium-calcium NCX possède deux modes de fonctionnement dits *forward* dans le cas d'une entrée de Na⁺ et d'une sortie de Ca²⁺ ou *reverse* dans le cas inverse, avec un ratio de 3 Na⁺ pour 1 Ca²⁺ dans les deux cas (**Figure 23**). Le choix du mode de fonctionnement dépend du gradient ionique et le rôle principal de cet échangeur est de permettre un retour à l'équilibre des concentrations ioniques. Dans le cas des astrocytes hippocampiques, son expression semble préférentiellement localisée au niveau des PAPs et colocalise fortement avec le transporteur du glutamate GLT-1 (Minelli *et al.* 2007). Rappelons que la capture du glutamate par les transporteurs implique un symport de 3 Na⁺ (**Figure 19**), qui est donc contrebalancé par la mise en jeu des NCX en échange d'une entrée de calcium. De manière intéressante, l'influx de calcium généré par le fonctionnement du NCX en mode inverse a été associé à un relâchement de gliotransmetteurs (Minelli *et al.* 2007). En résumé, le fonctionnement du NCX en mode inverse est complémentaire de la recapture du glutamate, associé avec la gliotransmission et cohérent avec l'excitabilité calcique observée indépendamment de la mise en jeu des stocks internes au sein des microdomaines. Il est important de noter ici que le NCX fait l'objet d'une importante expression neuronale et semble jouer un rôle important dans la dynamique ionique à la fois pré- et post-synaptique (Minelli *et al.* 2007). Par conséquent, cibler le NCX serait particulièrement dommageable pour l'activité synaptique. En revanche, le dernier type d'acteur membranaire impliqué dans l'influx de calcium nous a particulièrement intéressés dans le cadre de ce travail de thèse. Il s'agit des canaux de la famille des *Transient Receptor Potential* (TRP) et plus particulièrement le canal TRP *ankyrin 1* (TRPA1).

b. Canal TRPA1

Les canaux TRP sont une famille de protéines membranaires très conservées au cours de l'évolution puisqu'ils agissent comme des senseurs de l'environnement cellulaire et particulièrement comme des senseurs de stress. Leur mise en jeu a été décrite dans des conditions de changement de température, de stress osmotique ou mécanique, en présence de

certaines composés chimique ou encore dans des conditions de stress oxydant (Samanta, Hughes and Moiseenkova-bell 2018). Cette famille de protéines compte 28 membres dont 27 sont présents chez l'homme répartis en six sous-familles qui sont toutes retrouvées au niveau du SNC. Les profils d'expression varient en fonction des structures mais on observe une prédominance d'expression pour les familles TRPV (*vanilloid*), TRPC (*canonical*) et TRPM (*melastatin*) (Verkhatsky, Reyes and Parpura 2013).

Au sein de la population astrocytaire, on retrouve des membres de la sous-famille des TRPC, qui ont été principalement étudiés sur des cultures primaires d'astrocyte et dont le principe de fonctionnement semble reposer sur le mécanisme des SOCE décrits précédemment (Verkhatsky and Nedergaard 2018). On note également deux membres de la sous-famille des TRPV : TRPV1 d'une part, qui semble préférentiellement exprimé au niveau des pieds astrocytaires dans les structures circumventriculaires (Mannari *et al.* 2013); TRPV4 de l'autre, que l'on retrouve exprimé dans les astrocytes corticaux et hippocampiques et dont le rôle a été associé à l'AQP4 dans la régulation de l'osmolarité à la suite de stress osmotiques (Benfenati *et al.* 2011). Le dernier représentant de la famille des canaux TRP qui est retrouvé au niveau astrocytaire correspond au canal TRPA1 (Verkhatsky, Reyes and Parpura 2013).

Le canal TRPA1 est un homotétramère dont chaque sous-unité contient 6 domaines transmembranaires et possède entre 14 et 18 répétitions ankyrines au niveau de l'extrémité N-terminale (**Figure 24**) (Mihara and Shibamoto 2015). Il s'agit d'un canal cationique qui présente une forte conductance (~ 110 pS) avec une forte perméabilité au Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 7,9$). Environ 23 % des courants mesurés au travers de ce canal sont liés au calcium (Verkhatsky, Reyes and Parpura 2013) ce qui permet d'assimiler ce canal à un canal calcique. Le mode

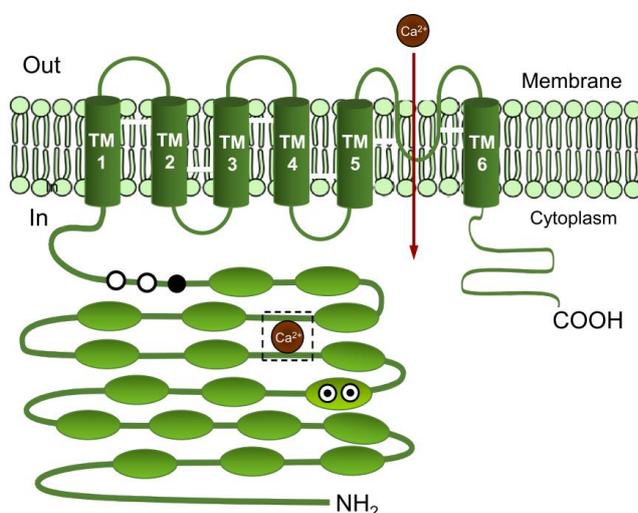


Figure 24 : Schéma de la structure d'une sous-unité du canal TRPA1. La sous-unité se caractérise par 6 domaines transmembranaires (TM) et par un long domaine N-terminal cytoplasmique composé de 14 à 18 répétitions ankyrines. Le canal TRPA1 est formé par l'assemblage de 4 sous-unités formant ainsi un homo-tétramère et le pore perméable au Ca^{2+} est formé par l'organisation des segments transmembranaires 5 et 6 de chaque sous-unité. (Adapté de Mihara et Shibamoto 2015).

d'activation de ce canal et le rôle fonctionnel des domaines ankyrines n'ont pas encore été clairement établis. Cependant, les répétitions ankyrines sont des motifs très fréquemment retrouvés qui sont impliqués dans des interactions protéine-protéine non spécifiques (Li, Mahajan and Tsai 2006). Par ailleurs, l'analyse structurale du canal TRPA1 a permis de mettre en évidence que ces motifs ankyrines communiquent avec le pore du canal (Paulsen *et al.* 2015), ce qui suggère une activation du canal *via* une modification covalente de ces répétitions ankyrines (Macpherson *et al.* 2007).

Le canal TRPA1 a en premier lieu été caractérisé pour son rôle au sein des neurones périphériques impliqués dans les afférences primaires nociceptives (Story *et al.* 2003). Son activation a été observée en présence de divers composés impliqués dans la douleur ou l'inflammation. Ces composés sont retrouvés, par exemple, dans les pollens ou encore dans la moutarde ou l'ail, ce qui lui a valu le surnom de récepteur au wasabi (Paulsen *et al.* 2015). Ces composés semblent agir comme des agonistes électrophiles mais les mécanismes exacts qui conduisent à la modification covalente des domaines ankyrines, responsable de l'activation du canal, sont encore mal compris (Macpherson *et al.* 2007).

Le canal TRPA1 a très peu été étudié dans le SNC. Ce sont les travaux du Dr Eiji Shigetomi et de ses collaborateurs qui ont permis de mettre en lumière l'implication de ce canal dans la signalisation calcique astrocytaire, notamment au sein de l'hippocampe. Dans un premier temps, ils ont montré que TRPA1 est impliqué dans des activités calcique astrocytaires très localisées en utilisant un agoniste de ce canal, l'*allyl isothiocyanate* (AITC), sur des co-cultures astrocytes-neurones d'hippocampe. En conditions physiologiques sur tranches aigües, ce canal joue un rôle dans la régulation du niveau basal de calcium intracellulaire mais son blocage par un inhibiteur spécifique, HC030031, n'altère pas l'activité spontanée des neurones pyramidaux (Shigetomi *et al.* 2012). Dans un second temps, ils ont montré que l'activité du canal TRPA1 est en lien avec la gliotransmission et notamment avec la libération de D-sérine, ce qui permet de relier l'activité de ce canal à la modulation de la plasticité synaptique à long terme (Shigetomi *et al.* 2013). Récemment, la stimulation mécanique des astrocytes par ultrasons ou avec une micropipette, a permis de mettre en évidence que TRPA1 se comporte comme un mécano-senseur également et que son activation par ce biais induisait une libération de glutamate *via* le canal Best-1, avec pour conséquence la modulation de l'activité des NMDAR (Oh *et al.* 2019). Cette étude a également permis de montrer par microscopie électronique et marquage par *immuno-gold* que le canal TRPA1 était majoritairement exprimé au sein des microdomaines astrocytaires dans l'hippocampe.

Il est intéressant de noter qu'une autre voie d'activation du canal TRPA1 suggère la mise en jeu de la cascade de signalisation de la phospholipase-C (PLC) (Wilson *et al.* 2011). Cette voie d'activation permettrait de concilier la prédominance d'expression des récepteurs métabotropiques au niveau des PAPs et l'observation d'activité calcique résiduelle dans les prolongements chez les souris IP₃R2-KO.

En résumé, l'étude des astrocytes au sein du SNC a permis de mettre en lumière le rôle essentiel de ces cellules dans l'homéostasie du SNC et la modulation de l'activité neuronale. Ces rôles sont médiés en partie par l'excitabilité calcique des astrocytes que l'on retrouve majoritairement au niveau de microdomaines le long des prolongements fins. Au travers des PAPs qui permettent la formation de synapses tripartites, l'activité calcique au sein de ces microdomaines semble être corrélée à des interactions étroites et bidirectionnelles avec les synapses. L'excitabilité calcique au sein de ces compartiments permet, entre autres, le relâchement de gliotransmetteurs et offre à l'astrocyte la capacité de moduler l'activité synaptique, de réguler la plasticité et donc, dans le cas de structures comme l'hippocampe, de contribuer aux fonctions mnésiques. La signalisation calcique mise en jeu requiert différents acteurs moléculaires dont le canal TRPA1, qui semble être activé principalement dans certaines conditions de stress cellulaire. Or, nous avons vu que la maladie d'Alzheimer se caractérise par une perturbation de l'homéostasie synaptique au cours des phases cellulaires. Il paraît donc intéressant de se pencher sur une implication possible des astrocytes et de la signalisation calcique astrocytaire dans les perturbations synaptiques observées dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

E. Astrocytes et maladie d'Alzheimer

1. Stades avancés et astroglie

Chez l'homme, que ce soit par analyse de tissus *post-mortem* ou par imagerie *PET-scan* sur des patients, on observe une astroglie importante entre les stades allant des MCI jusqu'aux premières formes de démences, alors que l'astroglie semble diminuer au cours des stades plus avancés associés à des démences importantes (Rodriguez-vieitez *et al.* 2016). Cette inflammation astrocytaire avait déjà été observée par Alois Alzheimer et se retrouve majoritairement présente à proximité des plaques amyloïdes (**Figure 25**). Cette astroglie est également observée chez l'ensemble des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer en lien avec la surproduction d'A β (Sasaguri *et al.* 2017) et elle s'accompagne d'altérations fonctionnelles des astrocytes. Le rôle bénéfique ou délétère de cette inflammation astrocytaire fait également l'objet d'un débat soutenu dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Comme nous l'avons vu précédemment, il semblerait qu'il existe une distinction entre des astrocytes

réactifs de type A1 ayant un rôle délétère et des astrocytes réactifs de type A2 ayant un rôle protecteur (Liddelw and Barres 2017). L'idée sous-jacente étant que l'évolution lente de la maladie d'Alzheimer se traduit également par une évolution de la physiologie astrocytaire, passant d'astrocytes non-réactifs à des astrocytes de type A2, puis à des astrocytes de type A1 (Arranz and De Strooper 2019). Ces derniers seraient directement impliqués dans la mort neuronale *via* la sécrétion de la protéine du complément C3, sachant que l'analyse de tissus *post-mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a montré que 60 % des astrocytes du cortex préfrontal expriment le gène responsable de la production de C3 (Liddelw *et al.* 2017).

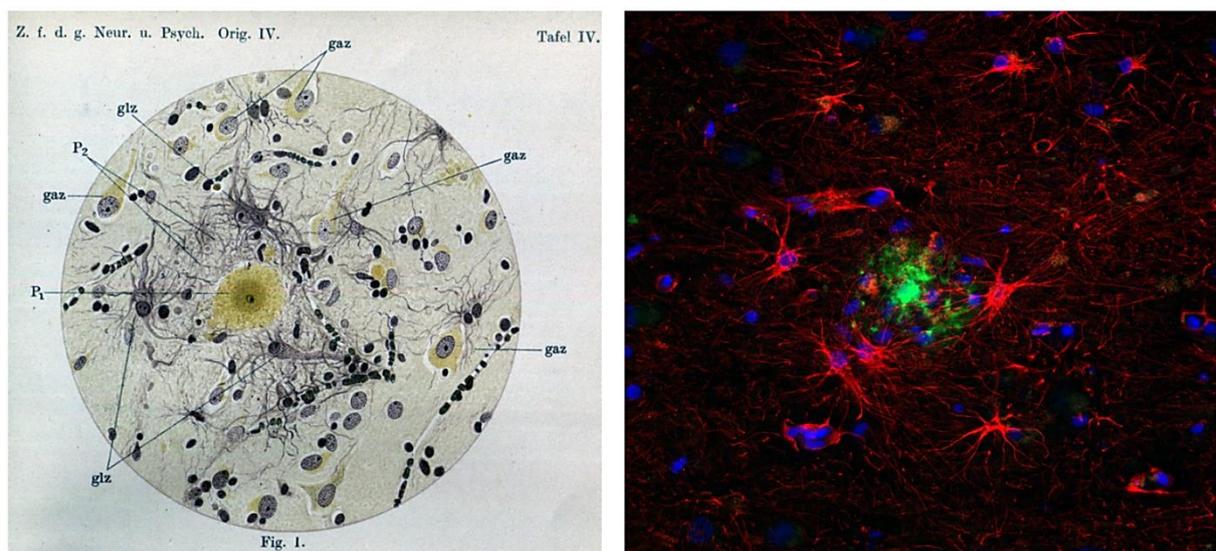


Figure 25 : Astrocytes réactifs à proximité des plaques amyloïdes. (Gauche) Cellules gliales hypertrophiées (glz) qui entourent une plaque amyloïde (P1) et qui l'isolent des neurones environnant (gaz). Dessin réalisé par Alois Alzheimer et publié dans Alzheimer and Förstl 1911. **(Droite)** Astrocytes réactifs marqués par anticorps anti-GFAP (rouge) qui entourent une plaque amyloïde marquée par un anticorps 6E10 (vert) dans l'hippocampe provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu) (Adapté de Osborn *et al.* 2016).

Concernant la signalisation calcique, il a été montré *in vivo* au sein du cortex de souris APP/PS1 entre 6 et 8 mois, que le niveau basal de calcium est doublé au sein des astrocytes réactifs et s'accompagne d'une hyperexcitabilité calcique synchrone et indépendante de l'activité neuronale (Kuchibhotla *et al.* 2009). Dans cette étude, les auteurs ont également observé la présence de vagues calciques se propageant au travers du réseau astrocytaire de manière radiale avec comme point de départ les plaques amyloïdes, alors que ce phénomène n'avait jamais été observé *in vivo* dans le cortex, en conditions physiologiques.

En 2014, les travaux du laboratoire du professeur Gabor Petzold ont permis de montrer que l'hyperactivité calcique observée dans les astrocytes réactifs est dépendante des récepteurs métabotropiques purinergiques P2Y1 chez des animaux APP/PS1-21 âgés de 5 à 9 mois. Cette perturbation de l'excitabilité calcique est associée à une dérégulation du contrôle de la vascularisation par l'astrocyte qui tend en faveur d'une vasoconstriction (Delekate *et al.* 2014). De manière intéressante, la perturbation du flux sanguin semble être également associée à une baisse du métabolisme énergétique. En effet, une étude réalisée sur le modèle 3xTg a mis en évidence une perturbation du métabolisme du glucose dans l'hippocampe à partir de 6-7 mois (Le Douce *et al.* 2020). Or, la glycolyse est essentielle pour plusieurs mécanismes astrocytaires dont la production de L-sérine qui sera transformée en D-sérine impliquée dans la gliotransmission. Ainsi, dans cette étude, les auteurs montrent que les souris 3xTg présentent une diminution de l'activation des NMDAR par la D-sérine, ce qui se traduit par une altération de la potentialisation à long terme et de la mémoire spatiale. L'inhibition chronique du récepteur P2Y1 (Reichenbach *et al.* 2018) ou l'apport exogène de L-sérine (Le Douce *et al.* 2020) permettent de normaliser la plasticité synaptique et la mémoire spatiale des animaux transgéniques.

Dans ce contexte pathologique, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes qui conduisent à l'astrogliose. L'activation microgliale et la sécrétion subséquente de facteurs pro-inflammatoires comme TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) ou IL1 α (*Interleukine 1 α*), constitue une des voies principales d'induction de l'astrogliose dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Liddelow *et al.* 2017). De plus, une concentration importante de TNF α a été observée dans le sérum de patients atteints de cette maladie par rapport aux sujets contrôles (Ekert *et al.* 2018). Un inhibiteur de TNF α , *ethanercept*, qui était déjà utilisé dans le traitement de l'arthrose rhumatoïde et qui semblait permettre une réduction du risque de développer la maladie d'Alzheimer chez les patients traités (Chou *et al.* 2016), a donc fait l'objet d'une étude clinique dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Cependant, les résultats n'ont pas été concluants (Decourt *et al.* 2017). De manière analogue, un antagoniste des récepteurs de IL1 α , *anakinra*, est en cours d'étude (Arranz and De Strooper 2019). Un autre mécanisme désigne la voie de signalisation intracellulaire de la protéine *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) comme étant nécessaire et suffisante pour la mise en place durable d'une astrogliose chez un modèle de souris APP/PS1 (Ceyzériat *et al.* 2018). Les auteurs ont également montré que la modulation de cette voie de signalisation dans l'hippocampe, à partir de 3 mois, permet d'empêcher le phénotype d'astrocyte réactif d'apparaître chez ces souris, ce

qui permet également de réduire la quantité de plaques amyloïdes et de restaurer les déficits synaptiques et mnésiques qui sont observés chez les souris non traitées à 9-10 mois. En revanche, la même approche utilisée dans le modèle 3xTg n'a pas permis d'observer une réduction des marqueurs moléculaires de la maladie (hyperphosphorylation de tau et plaques amyloïdes), ni une restauration des fonctions mnésiques (Guillemaud *et al.* 2020). Même s'il existe plusieurs différences entre ces deux études, cela suggère que l'implication des astrocytes réactifs dans la physiopathologie associée à la maladie d'Alzheimer peut être hétérogène en fonction du contexte pathologique et des facteurs épidémiologiques.

De plus, comme nous l'avons vu, il semblerait que l'évolution de la maladie d'Alzheimer soit associée à une évolution de l'astrogliose qui passe par une perte de fonctions protectrices et un gain de fonctions toxiques. Il paraît donc difficile d'évaluer la bonne fenêtre temporelle pour cibler l'inflammation, au risque de bloquer des mécanismes protecteurs comme la libération de *transforming growth factor β* (TGF- β) (Diniz *et al.* 2017) et donc d'aggraver le phénotype (Kraft *et al.* 2013). Le blocage de la voie de signalisation de STAT3 sur des astrocytes en culture, avait notamment été décrite comme étant responsable de l'augmentation du stress oxydant (Sarafian *et al.* 2010). Par ailleurs, la majeure partie des thérapies anti-inflammatoires qui ont été testées jusqu'ici chez l'homme sont basées sur des agents capables de diminuer l'inflammation globale, comme les inhibiteurs de TNF α par exemple. Le manque d'efficacité de ces approches pourrait en partie s'expliquer par le manque de spécificité des substances utilisées et donc l'affaiblissement des sous-populations de cellules gliales ayant un rôle protecteur (Uddin *et al.* 2020). Les stratégies envisageables à l'avenir devront donc s'appuyer sur des approches plus spécifiques, comme le ciblage des astrocytes réactifs de type A1 par exemple (Arranz and De Strooper 2019).

Le rôle délétère de l'astrogliose dans le contexte de la maladie d'Alzheimer peut également être nuancées par une étude de 2016 qui a mis en évidence l'implication du canal TRPA1 dans les mécanismes physiopathologiques observés chez des souris APP/PS1 (Lee *et al.* 2016). Les auteurs ont observé une augmentation significative de l'expression de TRPA1 dans le cerveau d'animaux transgéniques de 8 mois, principalement au niveau des astrocytes de l'hippocampe. Le croisement des souris APP/PS1 avec des souris KO pour le gène de TRPA1 a permis de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et de limiter la présence de plaques amyloïdes et de restaurer les déficits cognitifs. Cependant, de manière surprenante, la délétion du gène codant pour TRPA1 induit une augmentation de l'astrogliose chez les souris APP/PS1.

Le décours temporel de la physiopathologie chez les animaux modèles indique que l'astroglie coïncide plus ou moins avec l'apparition des premières plaques amyloïdes et se retrouve de manière prédominante à proximité de celles-ci (Rodriguez-arellano *et al.* 2016; Sasaguri *et al.* 2017). Or, nous avons vu dans la première partie de cette introduction que le déclenchement de la maladie est plutôt associé aux formes solubles du peptide A β . A partir de ce constat, la question qui nous a intéressés est de savoir si les formes solubles du peptide peuvent être responsables de perturbations de la physiologie astrocytaire en amont de l'astroglie et de déterminer si ces perturbations astrocytaires peuvent jouer un rôle dans les altérations synaptiques précoces qui ont été observées.

2. Stades précoces et physiologie astrocytaire

La perturbation de la physiologie astrocytaire a très peu été étudiée au cours des stades précoces. Nous avons décrit précédemment ces stades comme ceux qui précèdent l'apparition des plaques amyloïdes et antérieurs à la mise en place de l'astroglie. Rappelons ici qu'une hyperactivité liée aux formes solubles oligomériques du peptide A β a été observée sur l'activité neuronale dans l'hippocampe de souris APP/PS1 bien en amont de l'apparition des premières plaques (Busche *et al.* 2012). Les travaux de Takano *et al.* en 2007 ont montré *in vivo* une augmentation de la fréquence des activités calciques spontanées au sein des astrocytes de cortex de souris 3xTg âgées de 2 à 4 mois, en lien avec des défauts précoces de vascularisation. Puis, les travaux de Pirttimaki *et al.* en 2013 ont montré une augmentation de la fréquence des activités calciques astrocytaires sur des tranches aigües d'hippocampe de souris APP_{swe} de moins d'un mois. Cependant, il est important de mentionner que seules les activités calciques somatiques ont été étudiées dans ces travaux. La question qui se pose à la suite de ces observations, est de savoir si les formes solubles oligomériques d'A β sont directement en lien avec cette hyperactivité astrocytaire très précoce.

3. Astrocyte et peptide A β

Pour rappel, nous avons vu que des concentrations picomolaires d'A β semblent correspondre à un niveau physiologique du peptide dans le milieu extracellulaire. Dans cette gamme de concentrations, A β favorise la libération de neurotransmetteurs et la plasticité synaptique au sein de l'hippocampe (Puzzo *et al.* 2008; Gulisano *et al.* 2019). Le laboratoire du professeur Ottavio Arancio a également mis en évidence que l'application de 200 pM d'oligomères d'A β ₁₋₄₂ sur des cultures primaires d'astrocytes, induit une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des activités calciques spontanées (Lee, Kosuri and Arancio 2014). Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, nous avons vu que l'hypothèse amyloïde désigne l'accumulation

d'A β o comme point de départ d'une cascade d'évènements physiopathologiques qui conduisent à la mise en place de la maladie (Selkoe and Hardy 2016). Les astrocytes sont d'ailleurs désignés comme étant responsables de l'accumulation du peptide selon certains travaux (Ries and Sastre 2016; Frost and Li 2017). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence que l'application aigüe d'A β à des concentrations jugées pathologiques (entre 100 nM et 5 μ M dans la littératures) perturbe l'excitabilité calcique des astrocytes en culture ou sur tranches organotypiques, avec pour finalité l'apparition d'une astroglie dans le cas d'applications prolongées (Verkhatsky 2019).

De manière intéressante, les travaux de Talantova *et al.* publiés en 2013 ont montré que l'application aigüe d'A β o sur des astrocytes d'hippocampe en culture, permet d'induire une libération rapide et massive de glutamate qui dépend d'un influx calcique. Ils ont également montré que le même type d'application sur des co-cultures neurones-astrocytes est responsable de l'activation préférentielle des récepteurs NMDA extra-synaptiques et que cela se traduit par une perte synaptique après 7 jours d'application. Ces observations suggèrent donc que la perturbation de l'excitabilité calcique astrocytaire induite par les formes solubles oligomériques d'A β est à l'origine d'une augmentation de la gliotransmission qui cible préférentiellement les récepteurs NMDA extra-synaptiques. Or, dans la première partie de cette introduction, nous avons vu qu'une suractivation des NMDAR extra-synaptiques est à l'origine de mécanismes excitotoxiques qui vont avoir un impact délétère sur le maintien des synapses et la survie cellulaire.

A β semble donc être responsable d'un influx calcique au sein des astrocytes qui induit une perturbation de la physiologie calcique astrocytaire. Une étude publiée en 2013 a montré que l'application d'A β o à 100 nM sur des cultures primaires d'astrocytes induit une augmentation de l'excitabilité calcique, dépendante de l'activation des récepteurs mGluR5, qui entraîne une libération d'ATP (Shrivastava *et al.* 2013). La libération d'ATP induite par l'activation de mGluR5 pourrait donc expliquer l'implication des récepteurs P2Y1 dans l'hyperactivité calcique observée par le laboratoire du professeur Petzold (Delekate *et al.* 2014). Sachant qu'A β induit une libération de glutamate par l'astrocyte, cette observation suggère la présence possible de boucles d'auto-entretien de l'hyperactivité calcique astrocytaire induite par A β . Lee *et al.* en 2016, ont également mis en évidence que l'application aigüe d'A β sur des cultures primaires d'astrocyte induit un influx de calcium dépendant du canal TRPA1.

Réunis ensemble, ces éléments nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'accumulation du peptide A β , désignée comme étant à l'origine la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, est

responsable d'une excitabilité calcique astrocytaire aberrante dans les tout premiers stades de la pathologie, provoquant une augmentation de la gliotransmission qui va faciliter la mise en place de mécanismes excitotoxiques au sein de la population neuronale. Le maintien de cette hyperexcitabilité calcique pourrait par la suite, être responsable de l'inflammation astrocytaire qui sera alors associée à la perturbation de différentes fonctions essentielles garantissant l'homéostasie du SNC.

OBJECTIFS

Face au besoin de trouver de nouvelles approches thérapeutiques, l'étude des astrocytes dans la maladie d'Alzheimer suscite un intérêt grandissant au sein de la communauté scientifique. Une grande partie des travaux réalisés sur ce sujet s'attèle à comprendre la physiologie particulière associée à l'astrogliose, qui constitue un des principaux marqueurs d'inflammation associés à la pathologie. Or, l'inflammation astrocytaire fait l'objet d'une dualité opposant mécanismes délétères et mécanismes protecteurs, ce qui complexifie l'émergence de cibles thérapeutiques efficaces. Dans ce contexte, il nous a paru pertinent d'étudier la physiologie des astrocytes dans les tout premiers stades de la pathologie, avant que l'astrogliose se mette en place. Ces stades précoces, qui précèdent également l'apparition des plaques amyloïdes, ont été récemment caractérisés par une hyperactivité neuronale asymptomatique, identifiée notamment au niveau de l'hippocampe chez l'homme. Cette première phase de la maladie est associée à l'augmentation des formes solubles oligomériques du peptide β -amyloïde dans le milieu extracellulaire. L'objectif de ce travail de thèse s'est donc déroulé en trois étapes suivant un axe majeur, qui est d'identifier une éventuelle implication astrocytaire dans la synaptotoxicité induite par $A\beta$.

- 1) Etudier la physiologie des astrocytes au sein de l'hippocampe en présence de concentrations pathologiques d' $A\beta$ et caractériser l'implication d'une cible moléculaire identifiée, le canal TRPA1.
- 2) Etudier l'implication du canal TRPA1 dans l'hyperactivité observée au sein de la population neuronale voisine au cours des stades précoces de la maladie.
- 3) Evaluer l'intérêt thérapeutique de cibler le canal TRPA1 sur le développement du phénotype pathologique à court, moyen et long terme dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé le modèle de tranches aigües de cerveau de souris qui permet d'étudier, à un niveau fonctionnel, la physiologie des astrocytes et des neurones dans un environnement où les structures et les interactions intercellulaires sont préservées. L'activité astrocytaire a été étudiée par imagerie calcique au sein du *stratum radiatum* de l'hippocampe, à la fois au sein du réseau astrocytaire, grâce à la mesure des activités somatiques de plusieurs cellules, mais également au sein des microdomaines le long des prolongements, grâce à l'étude sur cellule unique. La physiologie neuronale a été étudiée en mesurant l'activité

Objectifs

électrophysiologique spontanée des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, grâce à la technique du *patch-clamp* en configuration cellule entière.

L'identification du canal TRPA1 et la mise en évidence du lien de causalité entre les perturbations observées au sein des deux types cellulaires ont été réalisées par différentes approches pharmacologiques.

Enfin, l'étude longitudinale de l'implication de TRPA1 sur le développement de la physiopathologie a été réalisée sur des souris APP/PS1-21 à un niveau fonctionnel, structural et comportemental. Des études immunohistochimiques et biochimiques nous ont permis de mesurer l'impact du blocage pharmacologique de TRPA1 sur les marqueurs classiques de l'évolution de la maladie d'Alzheimer. L'évaluation des performances mnésiques chez ces animaux a été réalisée par la mise au point de tests comportementaux, notamment le test du labyrinthe de Barnes.

A. Mesure de l'activité électrophysiologique neuronale spontanée

1. *Patch-clamp* en configuration cellule entière

En 1976, Erwin Neher et Bert Sakmann ont mis au point la technique du *patch-clamp*, révolutionnant ainsi l'étude des canaux ioniques (Sakmann and Neher 1984), ce qui leur a valu de recevoir le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leur travaux en 1991. Il s'agit d'une technique qui se décline en plusieurs configurations et qui constitue toujours, à l'heure actuelle une technique de référence en électrophysiologie. Dans cette étude, nous avons eu recours à la configuration « cellule entière ».

Cette technique repose sur l'utilisation de deux électrodes. Une première électrode, dite d'enregistrement, est placée dans une micropipette de verre contenant une solution mimant la composition ionique du milieu intracellulaire (105 mM K-gluconate, 30 mM KCl, 10 mM phosphocreatine, 10 mM HEPES, 4 mM ATP-Mg, 0.3 mM GTP-Tris, 0.3 mM EGTA, pH à 7,2). Une deuxième électrode, dite de référence, est placée dans le milieu extracellulaire. A l'aide d'un micro-manipulateur, la pipette de verre est dans un premier temps amenée au contact de la membrane de la cellule. L'application d'une pression négative permet d'établir une jonction étanche entre la membrane et la pipette. Puis, une force de succion brève est appliquée pour rompre la portion de membrane située sous la pipette, afin d'établir une continuité entre le milieu intra-pipette et le milieu intracellulaire de la cellule enregistrée. L'électrode d'enregistrement correspond alors au potentiel intracellulaire et l'électrode de référence au potentiel extracellulaire. La différence de potentiel entre les deux électrodes dépend donc des propriétés membranaires de la cellule « patchée » (**Figure 26**).

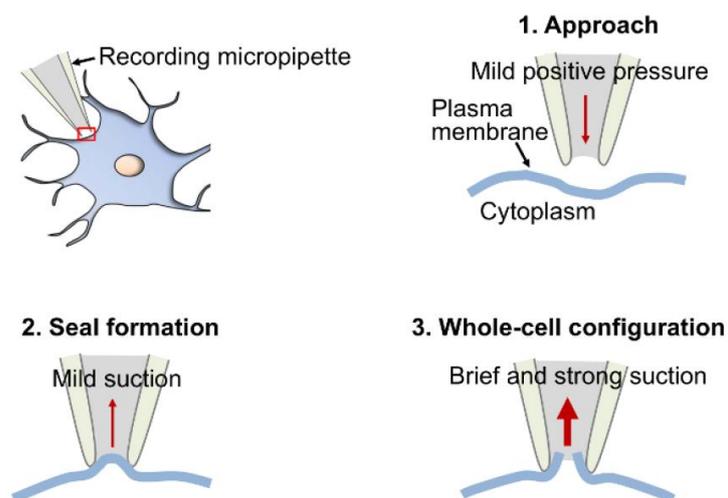


Figure 26 : Schéma de la procédure pour établir la configuration cellule entière du *patch-clamp*. (Adapté de Segev *et al.* 2016)

2. Mesure des courants spontanés

Une des approches expérimentales principale utilisée dans ce travail de thèse a consisté à utiliser la technique du *patch-clamp* en configuration cellule entière sur les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe au sein de tranches aigües de cerveau de souris (**Figure 27A**). Le but était de mesurer les courants post-synaptiques excitateurs spontanés (sEPSC) de ces neurones. Ces courants sont associés à l'activation des récepteurs post-synaptiques, faisant suite à la libération massive de neurotransmetteurs dans le cadre d'une activité synaptique excitatrice spontanée survenant au sein de la tranche de cerveau. Ils se distinguent des courants miniatures qui sont le reflet de fusions spontanées de vésicule présynaptique et qui sont d'amplitude moindre. Une fois la cellule patchée, cela nécessite de fixer le voltage entre les deux électrodes à -60 mV, ce qui correspond à une valeur proche du potentiel membranaire de repos des neurones, on parle alors de potentiel imposé. Dans cette configuration, les mouvements ioniques provoqués au niveau de la membrane vont entraîner une variation du potentiel membranaire et faire varier le voltage entre les deux électrodes. Le système va donc injecter un courant pour ramener la tension à la valeur fixée. Les courants injectés sont ainsi décrits comme le corrélat de l'activité membranaire du neurone « patché » et donc celui de l'activité synaptique. Une fois la configuration cellule entière atteinte, les neurones bénéficient de 5 min de stabilisation, puis leur activité est enregistrée jusqu'à 30 min en vérifiant toutes les 5 min que les paramètres de résistance d'accès et résistance membranaire n'évoluent pas au-delà de

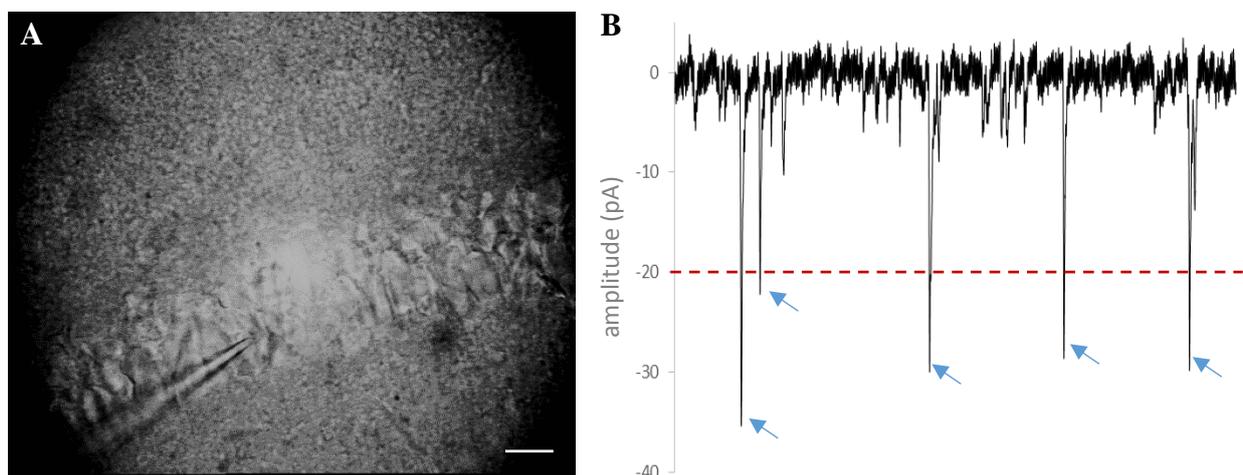


Figure 27 : Mesure de l'activité électrophysiologique spontanée des neurones de l'hippocampe. (A) Image par microscopie à contraste interférentiel différentiel infrarouge d'une tranche aigüe de cerveau de souris montrant un corps cellulaire neuronal patché à l'aide d'une micropipette de verre, au sein de la couche CA1 de l'hippocampe. Barre d'échelle : $40 \mu\text{m}$ **(B)** Exemple d'enregistrement de 30 s de l'activité spontanée d'un neurone de la région CA1. Les sEPSC (flèches bleues) sont distingués des courants miniatures grâce à une détection automatique par seuillage de l'amplitude à -20 pA. (trait pointillé rouge)

20 % des valeurs initiales. On obtient ainsi des enregistrements comme celui présenté en **Figure 27B** et par convention, les courants correspondants à un influx d'ions positifs sont représentés par une déflexion vers le bas. L'analyse de ces enregistrements est réalisée à l'aide du logiciel Clampfit 10.7 (*Molecular Devices*). La détection des sEPSC se fait automatiquement selon un seuillage de l'amplitude à -20 pA pour ne pas tenir compte des courants miniatures. Les paramètres tels que l'amplitude et la fréquence des courants détectés sont extraits et analysés.

Au sein des enregistrements, on distingue également des courants appelés *Slow Inward Currents* (SICs) (Pirttimaki, Hall and Parri 2011). Ces courants ont été décrits comme étant liés à une libération de glutamate astrocytaire non vésiculaire ciblant spécifiquement les récepteurs NMDA extra-synaptiques. Ils se caractérisent par une empreinte électrophysiologique particulière avec une cinétique lente (**Figure 28**). Il est donc possible d'isoler les SICs des autres sEPSC, en sélectionnant les événements ayant un *rise time* (temps entre le début de l'évènement et le point d'amplitude maximum) supérieur à 20 ms et d'analyser les paramètres d'amplitude et de fréquences de ces courants.

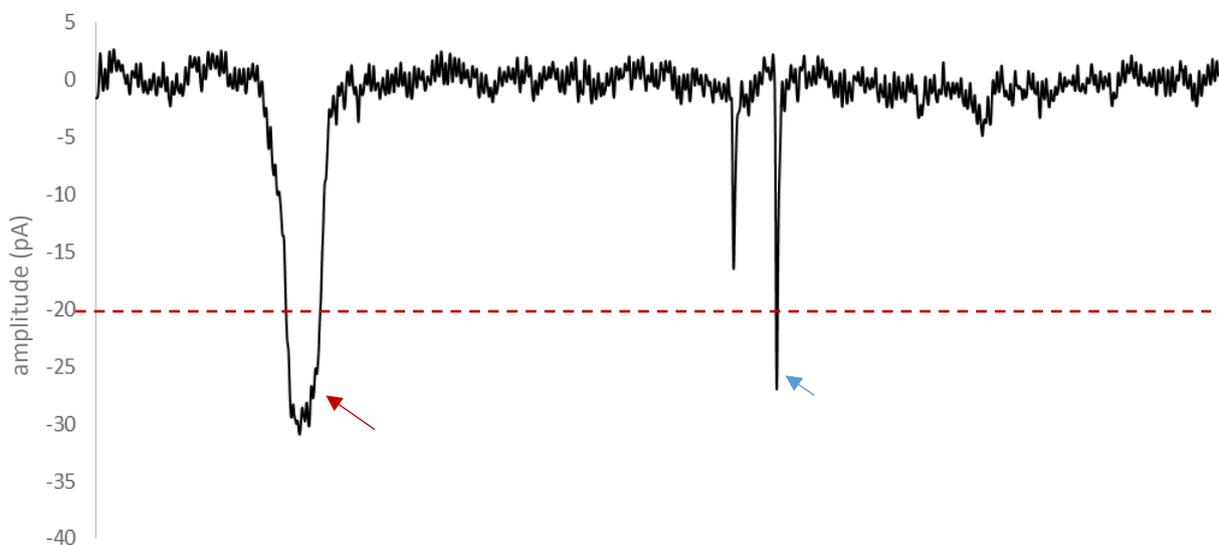


Figure 28 : Empreinte électrophysiologique d'un SIC versus un EPSC. Exemple d'enregistrement de 5 s de l'activité spontanée d'un neurone pyramidal d'hippocampe sur aiguë de cerveau de souris. Les SICs (flèche rouge) présentent une cinétique plus lente que les sEPSC (flèche bleue), avec un *rise time* supérieur à 20 ms.

B. Mesure de l'activité calcique dans les microdomaines astrocytaires

Les techniques d'étude de l'activité calcique utilisant des sondes chimiques, avec une queue acétoxy-méthyl les rendant perméantes, permettent d'étudier principalement les activités somatiques des cellules. Ces sondes ne permettent pas de charger suffisamment les astrocytes pour avoir accès aux activités calciques dans les microdomaines, le long des prolongements fins. Les travaux publiés par Nett et ses collaborateurs en 2002, ont permis pour la première fois d'observer l'activité calcique dans les prolongements astrocytaires en détournant la technique du *patch-clamp* en configuration cellule entière pour délivrer une sonde calcique chimique non perméante au sein d'un astrocyte unique.

Le projet de notre équipe était d'étudier l'activité calcique des astrocytes situés au niveau du *stratum radiatum* de l'hippocampe sur des tranches aigües de cerveau de souris (**Figure 29A**). Cette région correspond à la zone où les neurones de la région CA3 forment des synapses avec les dendrites des neurones de la région CA1 et où il a été observé chez le rat qu'entre 60 et 90 % des synapses sont enrobés par un prolongement astrocytaire (Witcher, Kirov and Harris 2007). L'approche utilisée par notre laboratoire consiste à utiliser une solution intra-pipette identique à celle décrite précédemment mais dépourvue d'EGTA et contenant 200 μM de Fluo-4, un indicateur calcique fluorescent. Après le passage en configuration cellule attachée, le Fluo-4 va diffuser passivement dans l'astrocyte pendant environ 5 min. Ensuite, la pipette de patch est minutieusement retirée, afin de permettre à la membrane plasmique de l'astrocyte de se refermer. L'acquisition par imagerie confocale est réalisée au moins 5 min après le retrait de la pipette afin de permettre la stabilisation de la diffusion de la sonde au sein de la cellule. Cette méthode nous a permis de charger une partie substantielle de l'arborisation astrocytaire, permettant d'avoir accès aux prolongements fins en contact avec les synapses (**Figure 29B**) (Di Castro *et al.* 2011). Les enregistrements sont acquis dans un seul plan focal (résolution en $z = 1 \mu\text{m}$) permettant de visualiser la plus grande surface possible, à une fréquence d'une image toutes les 1,2 s d'intervalle sur une période de 5 min.

Nous avons ensuite mis au point une méthode d'analyse des signaux calciques, qui soit adaptée à la quantité d'informations fournies par cette méthode. L'étude de Di Castro et ses collaborateurs publiée en 2011 avait mis en évidence une compartimentation de l'activité calcique dans les prolongements, délimitée par des territoires d'environ $1 \mu\text{m}^2$. Nous avons donc placé manuellement, le long des prolongements accessibles dans le plan focal imagé, des régions d'intérêt (ROI) d'approximativement $1 \mu\text{m}^2$ (**Figure 29C**). La proportion de territoires présentant une activité calcique au cours de l'enregistrement ainsi que la fréquence des activités

dans les territoires actifs ont été enregistrés à l'aide d'un logiciel (CalSignal) permettant d'analyser l'activité calcique, basé sur le calcul du ratio de fluorescence $\Delta F/F_0$, où F_0 est déterminée à partir de l'intensité de fluorescence moyenne de toutes les ROI (Platel *et al.* 2007).

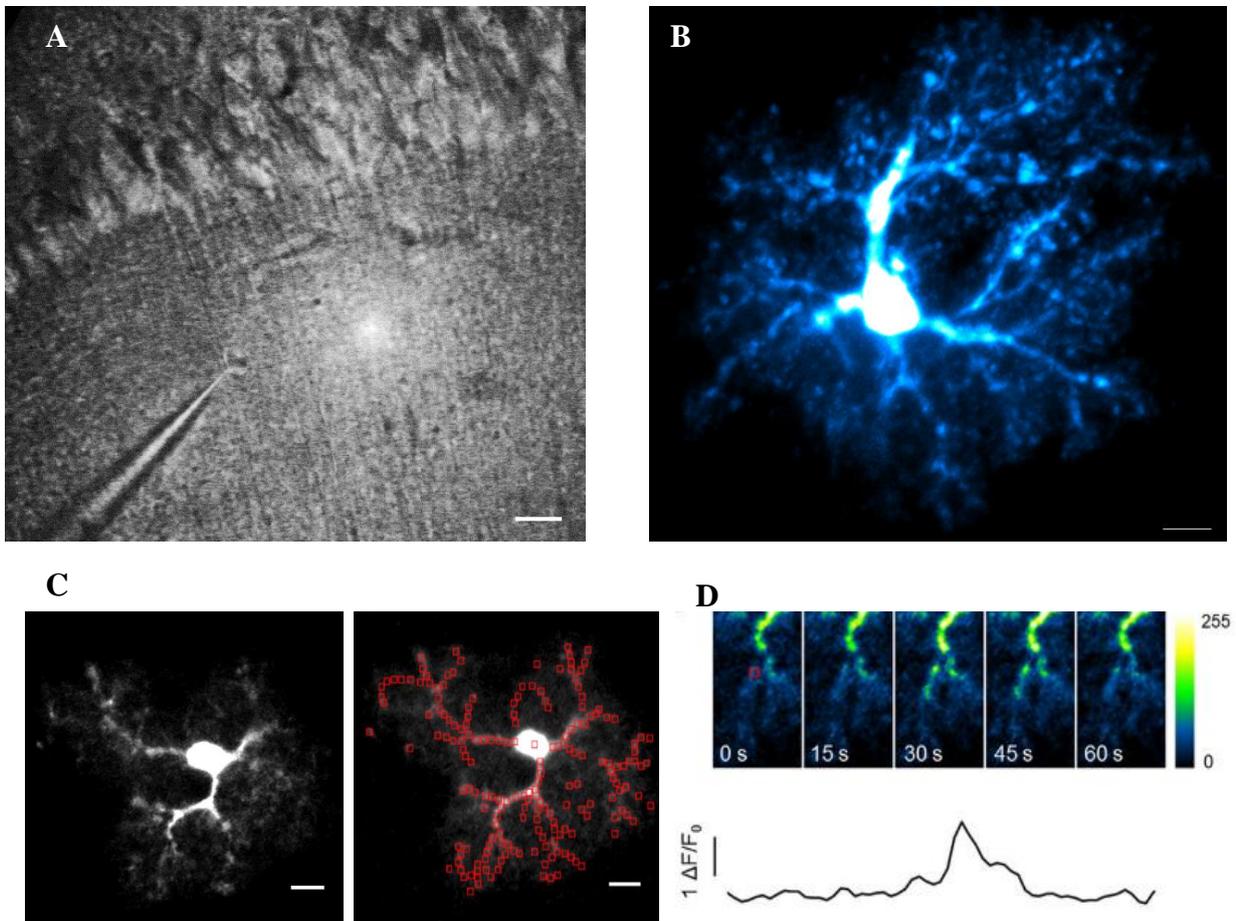


Figure 29 : Mesure de l'activité calcique spontanée au sein de l'arborisation d'un astrocyte unique chargé passivement avec du Fluo-4 via une micropipette. (A) Image par microscopie à contraste interférentiel différentiel infrarouge d'une tranche aigüe de cerveau de souris montrant un corps cellulaire d'astrocyte, situé dans la région du *stratum radiatum* de l'hippocampe, patché par une micropipette de verre. Barre d'échelle : 15 μm . **(B)** Projection maximum des différents plan focaux d'un astrocyte chargé avec du Fluo-4 via une micropipette. Barre d'échelle : 5 μm . **(C)** Plan focal unique d'un astrocyte chargé avec du Fluo-4 (gauche) et les ROI associées positionnées manuellement le long de l'arborisation (droite). Barre d'échelle : 5 μm . **(D)** (haut) *Time-lapse* d'imagerie calcique au sein d'un prolongement astrocytaire montrant un exemple d'activité calcique survenant dans un prolongement. (bas) Détection du signal de fluorescence $\Delta F/F_0$ correspondant à la ROI (carré rouge) du panneau du haut.

C. Inhibition chronique du canal TRPA1 chez la souris

Pour l'inhibition chronique du canal TRPA1, nous avons utilisé l'inhibiteur spécifique, HC030031. Cet inhibiteur a été utilisé par plusieurs études portant sur le rôle de TRPA1 dans les douleurs neuropathiques attestant le passage de la BHE par l'inhibiteur et nous permettant

d'établir qu'une dose quotidienne de 5 mg/kg chez la souris est une dose efficace n'induisant aucune toxicité (Mcnamara *et al.* 2007; Eid *et al.* 2008; Trevisan *et al.* 2016). L'HC030031 est peu stable en solution aqueuse et ne permet pas l'utilisation de pompe osmotique pour délivrer le composé de manière continue. Nous avons donc procédé à des injections quotidiennes par voie intra-péritonéale en solubilisant l'inhibiteur dans une solution de sérum physiologique contenant 16 % de DMSO et 0,6 % d'acide Pluronic F-127.

L'expression des transgènes du modèle murin APP/PS1-21 que nous utilisons sont sous le contrôle du promoteur Thy-1, permettant une expression importante dès la fin de la deuxième semaine post-natale, notamment au niveau de l'hippocampe (Caroni 1997; Porrero *et al.* 2010). Nous avons donc démarré les injections intra-péritonéales à partir de P15 (15ème jour post-natal) afin de bloquer le canal TRPA1 dès qu'A β est surproduit dans le cerveau. Une série d'expériences préliminaires nous a permis de montrer qu'une administration tous les deux jours n'était pas suffisante pour bloquer les perturbations observées à 1 mois chez les animaux APP/PS1. Dans nos conditions, l'inhibition chronique du canal TRPA1 nécessite donc une injection quotidienne pendant 1 mois, 3 mois ou 6 mois selon les groupes. Pour cela, nous utilisons des aiguilles à insuline (30G) avec une alternance de la zone d'injection et nous procédons à une veille quotidienne du bien-être des animaux pour éviter l'apparition d'hématomes ou de lésions cutanées liés aux injections répétées. Ce projet a été évalué favorablement par le Comité d'Ethique n°004 et a reçu l'autorisation APAFIS #19142-2018121715504298.

D. Evaluation de la mémoire spatiale chez la souris par le labyrinthe de Barnes

Le test du labyrinthe de Barnes a été conçu dans le but d'évaluer l'apprentissage et la mémoire spatiale chez le rongeur (Barnes 1979). Les informations spatiales récoltées dans un environnement non familier sont soit incorporées de manière transitoire dans la mémoire de travail, soit de manière plus permanente dans la mémoire de référence. L'hippocampe joue un rôle majeur dans l'encodage et le stockage de ces informations. Dans le labyrinthe de Barnes, l'animal est placé au centre d'une plateforme circulaire située à 1 m par rapport au sol et percée de 20 trous en périphérie (**Figure 30**). Un de ces trous permet l'accès à une petite boîte refuge, appelée *escape box*. Le but du test repose sur l'instinct des souris qui les motive à éviter un environnement découvert et fortement éclairé (200 lumens au centre de la plateforme) et donc à trouver refuge dans l'*escape box*.

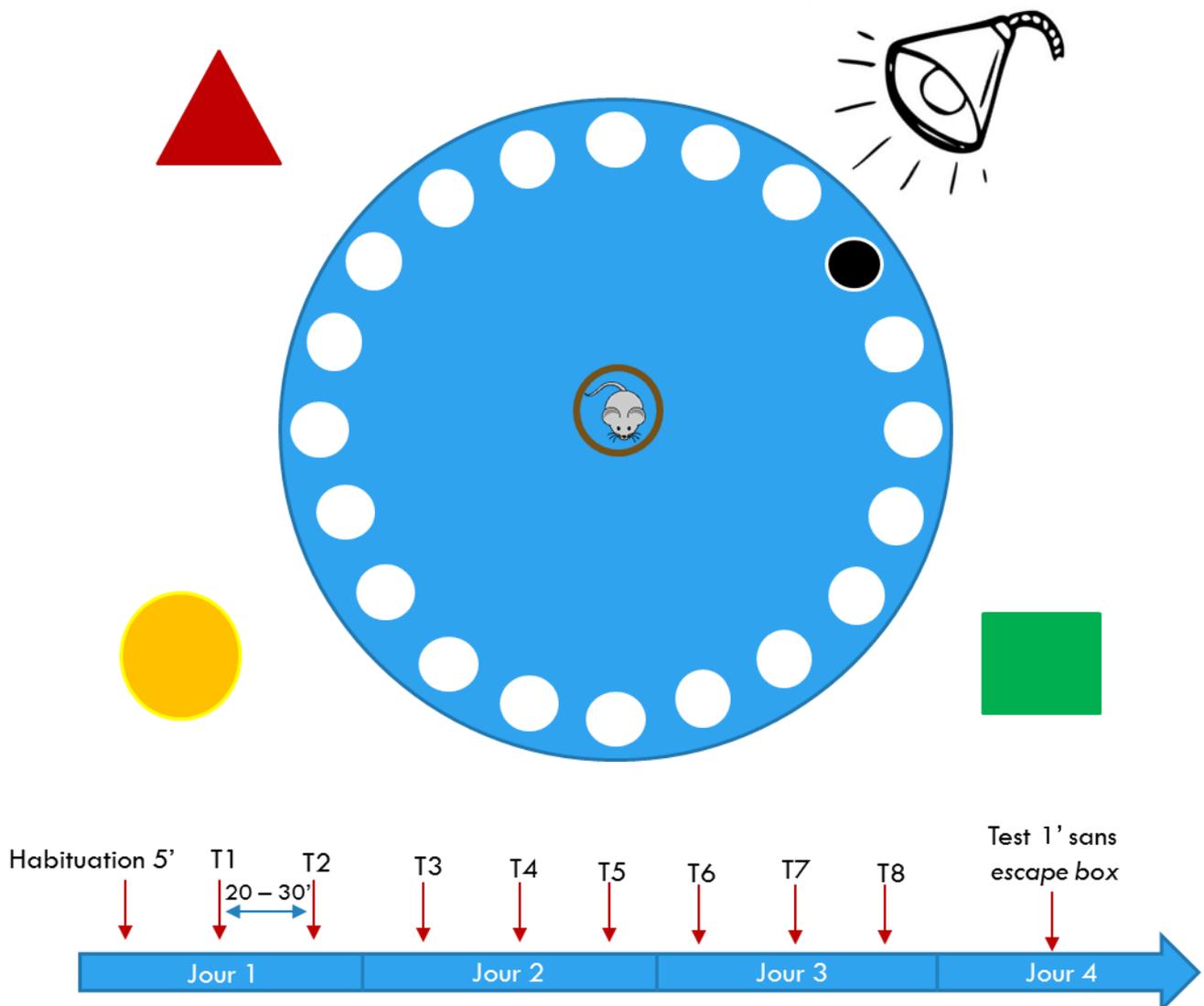


Figure 30 : Représentation schématique du test du labyrinthe de Barnes. Après une première phase d'habituation de 5 min, les souris réalisent 8 essais (T1 à T8) répartis sur 3 jours consécutifs avec 20 à 30 min d'espacement entre deux essais intervenant le même jour. Au départ de chaque essai, l'animal est placé dans un cylindre opaque et une fois le cylindre retiré l'animal dispose de 3 min pour rejoindre l'*escape box*. Pour un animal donné, l'*escape box* est toujours associée au même trou tout au long des 8 essais et pour permettre de localiser son emplacement des repères visuels sont disposés autour de la plateforme (formes géométriques colorées). Afin de motiver la recherche de l'*escape box*, nous utilisons une lumière, dont l'intensité est mesurée à 200 lumens au centre de la plateforme, qui représente un stimulus aversif pour l'animal. Les performances des animaux au cours des 8 essais permettent d'évaluer la mémoire de travail liée à l'apprentissage. 24h après le dernier essai un test de 1 min est réalisé sans *escape box* pour évaluer la mémoire de référence vis-à-vis de l'emplacement cible.

A la suite d'une première phase d'habituation de 5 min, les souris réalisent 8 essais répartis sur 3 jours avec un intervalle de 20 à 30 min entre les essais ayant lieu un même jour. Pour un animal donné, l'*escape box* est située toujours au niveau du même trou pour l'ensemble des essais. Au départ de chaque essai, l'animal est placé au centre de la plateforme dans un cylindre opaque pendant 30 s, permettant ainsi de le désorienter. Une fois le cylindre retiré, l'animal a 3 min pour réussir le test. En cas d'échec, l'animal est délicatement poussé par l'expérimentateur afin de rejoindre l'*escape box*, lui permettant par la suite de rejoindre sa cage. La répétition du test est censée permettre à l'animal de se forger une représentation allocentrique de l'environnement basée sur des repères visuels placés autour de la plateforme, lui permettant de réussir le test de plus en plus rapidement. Après chaque essai, la latence pour rejoindre l'*escape box* est mesurée et en cas d'échec un score maximal de 180 s est attribué. Cette première phase correspond à la phase d'apprentissage du test et est associée à la mémoire de travail. Elle permet à l'animal de constituer une mémoire de référence en rapport avec la localisation de l'*escape box*, qui est évaluée par la deuxième phase du test. Cette deuxième phase se déroule 24 h après le dernier essai et consiste à réaliser un test d'1 min sans *escape box*, au cours duquel la latence pour retrouver le trou cible est mesurée. Le retrait de l'*escape box* permet de s'assurer que l'animal a mémorisé l'emplacement du trou cible et ne se sert que des repères visuels allocentriques.

Le test du labyrinthe de Barnes est similaire au test de la piscine de Morris, mais est plus adapté aux souris car moins stressant. Il a été mis en évidence que les souris sont de moins bonnes nageuses que les rats et donc moins à l'aise dans un environnement aqueux, par conséquent, garder la tête en dehors de l'eau leur demande plus d'effort ce qui altère leurs performances (Whishaw and Tomie 1996).

Ce test nous a permis d'évaluer les fonctions mnésiques chez des animaux de 6 mois sous traitement chronique. Quatre groupes ont ainsi été comparés, deux groupes correspondant aux animaux APP/PS1 et à leurs *littermates* de type sauvage injectés quotidiennement avec l'inhibiteur du canal TRPA1 et deux groupes correspondant aux animaux APP/PS1 et leurs *littermates* de type sauvage injectés quotidiennement avec une solution véhicule. Du fait des injections quotidiennes, tous les animaux ont été habitués à être manipulés par l'homme. La dernière injection a été réalisée 24h avant le début de la phase d'étude comportementale.

RESULTATS

Implication du canal TRPA1 dans l'hyperactivité calcique astrocytaire et les dysfonctions synaptiques induites par A β

Dans une première étude publiée dans *Molecular Neurodegeneration* en 2017, nous avons étudié l'implication du canal TRPA1 dans les perturbations physiologiques astrocytaires et neuronales induites par les formes solubles oligomériques du peptide A β .

Les résultats obtenus indiquent que l'application exogène de 100 nM d'A β pendant 5 min sur des tranches aigües de cerveau de souris, est responsable d'une hyperexcitabilité observée par imagerie calcique au sein des astrocytes du *stratum radiatum* de l'hippocampe. Cette hyperexcitabilité se mesure au niveau de l'activité calcique somatique mais également au sein des microdomaines le long des prolongements fins. En bloquant l'excitation neuronale avec de la tétródotoxine (TTX) nous avons mis en évidence que cette hyperexcitabilité astrocytaire induite par A β est indépendante de l'activité neuronale. L'utilisation de l'HC030031, qui est un antagoniste spécifique du canal calcique TRPA1, nous a également permis d'identifier la nécessité de l'activité de ce canal pour la mise en place de cette hyperexcitabilité astrocytaire.

L'étude de l'activité électrophysiologique spontanée des neurones de la région CA1 de l'hippocampe, nous a permis de constater une hyperactivité liée à une fréquence de courants anormalement élevée en présence de 100 nM d'A β après 5 min d'application. L'inhibition du canal TRPA1 en présence d'A β permet de restaurer l'activité neuronale à un niveau physiologique.

Une hyperactivité similaire au sein de l'hippocampe est observée chez des animaux APP/PS1 de moins d'un mois, à la fois au niveau astrocytaire et au niveau neuronal. Chez ces animaux, cela correspond à un stade précoce qui suit rapidement le début de la surproduction du peptide A β et qui précède l'apparition des premières plaques et de l'astrogliose (3 – 4 mois dans ce modèle). L'inhibition du canal TRPA1 par application aigüe d'HC030031 sur les tranches aigües de cerveau de ces souris APP/PS1 permet de restaurer l'activité des deux types cellulaires vers un niveau basal, équivalent aux souris de type sauvage.

En conclusion, cette première étude indique une perturbation de la physiologie astrocytaire dans les tout premiers stades de la pathologie, en lien avec la surproduction du peptide A β et donc avec la présence de formes solubles oligomériques du peptide dans l'environnement. Cette perturbation astrocytaire semble être responsable d'une perturbation de l'activité synaptique des neurones avec lesquels ils interagissent et les données obtenues décrivent le ciblage de TRPA1 comme étant potentiellement pertinent pour bloquer ces perturbations précoces. La première question qui découle de ces travaux est donc de savoir si le blocage précoce des perturbations observées sur le modèle APP/PS1, grâce à l'inhibition du canal TRPA1, permettrait d'empêcher la mise en place d'évènements physiopathologiques critiques associés au développement de la pathologie sur ce modèle. La deuxième question vise à identifier les mécanismes responsables de la mise en place de l'hyperactivité neuronale subséquente à cette hyperactivité astrocytaire.

Dans cette étude, j'ai pris en charge l'intégralité des expériences d'électrophysiologie neuronale (Fig. 7), ainsi qu'une partie des expériences portant sur l'étude de l'activité du réseau astrocytaire par imagerie calcique (Fig. 2a et 2b ; Fig. 3a et 3b ; Fig. 4b et 4c et Fig. 6a).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

TRPA1 channels promote astrocytic Ca^{2+} hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide



Anthony Bosson^{1,2}, Adrien Paumier^{1,2}, Sylvie Boisseau^{1,2}, Muriel Jacquier-Sarlin^{1,2}, Alain Buisson^{1,2†} and Mireille Albrieux^{1,2*†} 

Abstract

Background: Excessive synaptic loss is thought to be one of the earliest events in Alzheimer's disease (AD). However, the key mechanisms that maintain plasticity of synapses during adulthood or initiate synapse dysfunction in AD remain unknown. Recent studies suggest that astrocytes contribute to functional changes observed during synaptic plasticity and play a major role in synaptic dysfunction but astrocytes behavior and involvement in early phases of AD remained largely undefined.

Methods: We measure astrocytic calcium activity in mouse CA1 hippocampus *stratum radiatum* in both the global astrocytic population and at a single cell level, focusing in the highly compartmentalized astrocytic arbor. Concurrently, we measure excitatory post-synaptic currents in nearby pyramidal neurons.

Results: We find that application of soluble A β oligomers (A β o) induced fast and widespread calcium hyperactivity in the astrocytic population and in the microdomains of the astrocyte arbor. We show that astrocyte hyperactivity is independent of neuronal activity and is repaired by transient receptor potential A1 (TRPA1) channels blockade. In return, this TRPA1 channels-dependent hyperactivity influences neighboring CA1 neurons triggering an increase in glutamatergic spontaneous activity. Interestingly, in an AD mouse model (APP/PS1–21 mouse), astrocyte calcium hyperactivity equally takes place at the beginning of A β production, depends on TRPA1 channels and is linked to CA1 neurons hyperactivity.

Conclusions: Our experiments demonstrate that astrocytes contribute to early A β o toxicity exhibiting a global and local Ca^{2+} hyperactivity that involves TRPA1 channels and is related to neuronal hyperactivity. Together, our data suggest that astrocyte is a frontline target of A β o and highlight a novel mechanism for the understanding of early synaptic dysregulation induced by soluble A β o species.

Keywords: Astrocyte, Calcium, Alzheimer, Synapse, TRPA1, APP/PS1

* Correspondence: mireille.albrieux@univ-grenoble-alpes.fr

[†]Equal contributors

¹University Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, Chemin Fortuné Ferrini, BP170, F-38000 Grenoble, France

²Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Formation of toxic amyloid- β ($A\beta$) species and their accumulation in plaques are key hallmarks in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) but it has now been recognized that, far ahead of plaques formation, soluble $A\beta$ oligomers ($A\beta_o$) are the pathology-triggering species [1]. More specifically, $A\beta_o$ manage a progressive loss of synaptic connectivity leading to neurodegeneration. Astrocytes are important safeguards of synaptic function and it becomes increasingly evident that these cells accomplish a more important role in brain function than previously thought. The loss of synapses may reflect functional downfall of astrocytes. These cells possess receptors and signaling machinery for all known neurotransmitters thus sensing neuronal activity [2]. They also actively secrete gliotransmitters such as ATP, glutamate, D-serine hence modulating activity of neuronal receptors [3, 4]. Consequently, through their involvement in the tripartite synapse, they both sense and modulate synaptic output [5].

Unlike neurons, astrocytes are electrically non-excitable cells but they are equipped with numerous channels, receptors or exchangers triggering Ca^{2+} signals. Thus, astrocytic excitability is based on highly spatiotemporally coordinated fluctuations of intracellular Ca^{2+} concentration relying on plasmalemmal and intracellular channels [6]. Important progress has been made in studying astrocytes branches Ca^{2+} signaling since they are the primary sites for interactions with neurons [7–9]. Direct monitoring of Ca^{2+} dynamics in the processes of adult mouse hippocampal astrocytes has revealed intense local and compartmentalized activity that is dissociated from activity in the cell body [8]. However, until recently, it was difficult to specifically explore this astrocytic calcium activity since channels and receptors involved in astrocytic calcium signaling were commonly expressed in neurons. However, among the receptors involved in astrocytic calcium signaling, transient receptor potential A1 (TRPA1) channel seems to be specifically expressed in astrocytes and absent from neurons within hippocampus *stratum radiatum* [10, 11]. The discovery of TRPA1 channel as an important mediator of Ca^{2+} entry restricted to astrocytes in the mouse hippocampus provided new opportunity to explore astrocyte signaling in relation to neuron-astrocyte interaction particularly in case of synaptic dysregulation.

In late transgenic AD mouse models, i.e. in phases associated with plaques formation, it has been shown that astrocytic calcium activity dramatically increases, becomes synchronous nearby $A\beta$ plaques and coordinates calcium signals at long distance [12]. Within somatosensory cortex, this astrocyte hyperactivity around plaques is mediated by purinergic signaling [13]. Surprisingly, astrocytes behavior and reactions in early

phases of AD remained largely undefined despite their probable involvement in the progressive loss of synaptic connectivity and in the complex and critical cellular phase of AD [14]. We thus chose to study the impact of soluble $A\beta$ oligomers on astrocytic function at the onset of early defensive cellular phase well before astrogliosis or inflammatory processes.

In this work, we monitored astrocytic calcium activity within the CA1 *stratum radiatum* region of the mouse hippocampus both at the astrocytic population level and at a single cell level, focusing in the astrocytic arbor. We characterized spontaneous Ca^{2+} signaling properties at these two related levels and showed that $A\beta_o$ exposition induced at once a global and a local Ca^{2+} hyperactivity. We showed that this hyperactivity was independent of neuronal activity and was totally restored to physiological level by blocking TRPA1 channels. This TRPA1 channels-dependent influence of $A\beta_o$ on astrocyte activity consequently impacted neighboring CA1 neurons, increasing glutamatergic spontaneous activity. In an AD mouse model, we showed that astrocyte hyperactivity was an early phenomenon setting up at the onset of $A\beta$ production, being also related to neuronal hyperactivity and preceding TRPA1 channel overexpression. Overall, our data provide a novel mechanism for the understanding of early toxicity of soluble $A\beta_o$ species.

Methods

Slice preparation

Coronal hippocampal slices (ranging from 300 to 350 μm thick) were prepared from Swiss mice (postnatal day 17–23; Janvier, Le Genest St Isle, France) or APP/PS1–21 transgenic mice [15] (postnatal day 19–28) together with control littermates. Mice were killed by decerebration and decapitated. The brain was rapidly removed and cut in ice-cold cutting ACSF containing (in mM): 2.5 KCl, 7 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 , 11 D-glucose and 234 sucrose bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 , with a vibratome VT1200S (Leica, Wetzlar, Germany). Slices containing the hippocampus were placed in ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl_2 , 2.5 CaCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 and supplemented with 1 mM sodium pyruvate at room temperature for a recovery period.

Slices bulk loading with Fluo-4 AM.

Briefly, 350 μm coronal slices were loaded with the calcium indicator dye Fluo-4 by immersion for 45 min at 35 $^\circ\text{C}$ in a bath containing 5 μM Fluo-4 AM (Life Technologies), 0.01% Pluronic acid F-127 (Molecular Probes), 0.005% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) and 0.05% DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) in

ACSF. The loading chamber was continuously oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂. Slices were then transferred into dye-free ACSF for at least 45 min prior to experiments. Mainly live astrocyte took up the fluorescent dye with these conditions [16, 17].

Single-astrocyte dye loading with Fluo-4

Coronal 300 μm slices were transferred to a chamber allowing constant perfusion with ACSF at room temperature, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 60× objective (NA 1.0) and an infrared-differential interference contrast optics with CCD camera (Optronix VX45, Kehl, Germany). Glass pipettes 8–11 MΩ (Harvard apparatus) were filled with intracellular solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.2 Fluo-4 pentapotassium salt (Life Technologies), adjusted to pH 7.2 with KOH. Signals were amplified by Axopatch 200B, sampled by a Digidata 1440A interface and recorded with pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA). Astrocytes were identified based on morphological, localization in the *stratum radiatum* and negative resting potential (between -70 and -80 mV). Input resistance was calculated by measuring current in response to a 10 mV pulse with 80 ms duration, near the end of the voltage command. Only passive astrocytes showing linear *I/V* relationship and low input resistance (~ 50 MΩ) were kept for dye loading. After achieving whole-cell configuration, access resistance was constantly monitored, and astrocytes were excluded from this study when this parameter varied >20% throughout the experiment. To allow sufficient diffusion of the dye and avoid astrocyte dialysis, the time in whole-cell configuration was limited to less than 5 min. Then, the patch pipette was carefully withdrawn to allow the astrocyte to recover. In order to maximize the diffusion of the dye into the astrocytic processes, we waited at least 15 min before calcium imaging [8, 18].

Calcium imaging

Bulk or single-astrocyte loaded slices were placed in a constantly perfused chamber on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 40× (NA 0.8) or 60× (NA 1.0) objective and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France). Excitation was achieved with light at 488 nm and emission was filtered with a 515 ± 15 nm filter. Images were acquired with EZ-C1 software (Nikon, Paris, France) at 1.2 s intervals in a single confocal plane over a period of 5 min.

Bulk loading calcium imaging data analysis

Prior to analysis, raw images were stabilized (when needed if slight *x-y* drift occurred during recordings, *z* drifts were excluded) using ImageJ plugin Template Matching. *CalSignal* software was used to measure intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal *F* within each region of interest (ROI) corresponding to the cell body area of each astrocyte [19]. *F*₀ was calculated for each ROI on the recording period. Based on the $\Delta F/F_0$ ratios, significant fluorescence variations were detected and a Ca²⁺ event was defined as a significant and continuous signal increase larger than a fixed threshold followed by a significant and continuous signal decrease larger than the same threshold. Thus, cells were defined as active when fluorescence increased ≥ 2 standard deviations relative to baseline fluorescence. After peak detection, each Ca²⁺ transients were visually checked by the operator. The theoretical Poisson distribution was calculated by the method of least squares approximating λ until it most closely fits the observed frequency distribution.

Single astrocyte loading data analysis

Ca²⁺ transients were measured in two-dimensional images, in individual subregions matching the shape of the astrocyte structure. Manually selected ROIs (~1 μm²) were placed along astrocytic processes lying in the focal plane [8] and a ROI was also selected in the soma if accessible. Prior to analysis, raw images were stabilized (when needed if slight *x-y* drift occurred during recordings, *z* drifts were excluded) using ImageJ plugins Template Matching and filtered with 3D Hybrid Median Filter [7]. *CalSignal* software was used to measure intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal *F* within each ROI. As described above, significant changes in fluorescence were detected on the basis of the calculated $\Delta F/F_0$ ratios. Each Ca²⁺ transients within ROI were visually checked by the operator and reported in a raster plot in order to discriminate focal activities from expanded ones (as described by [8]). At the end of each recording, *z*-stacks (0.5 μm steps) were performed to obtain tri-dimensional projections of astrocyte territories revealed by Fluo-4 loading. Images were then filtered with 3D Hybrid Median Filter plugin in ImageJ.

Electrophysiological recordings

Whole-cell recordings were made from the somata of visually identified CA1 pyramidal neurons. Patch pipettes (4–6 MΩ) were filled with an internal solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.3 EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH. Spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) were collected at a membrane holding potential of -65 mV which is close to the reverse potential

of GABA. All recordings were done at room temperature (22–24 °C) and only a single neuron was studied per slice. sEPSCs and their kinetics were analyzed in 5-min epochs within the time frame of the recordings. Each epoch was compared to the initial 5-min recording and sEPSCs frequencies were normalized to this initial value. Access resistance was constantly monitored and recordings were excluded from this study when this parameter varied >20% throughout the experiment. Recordings were analyzed using the Clampfit module of the pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA) with a threshold at -20 pA to exclude miniature EPSCs.

A β oligomerization, monomer purification and drug application

Recombinant A β _{1–42} peptide (Bachem) was resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete resuspension as described previously [20]. Following HFIP evaporation, A β oligomers were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO, then to 100 μ M in ice-cold ACSF with immediate vortexing and bath sonication, and then incubated at 4 °C for 24 h with mild agitation.

When appropriate, the A β monomer is purified on a C18 column (SPE-Chromabond-HRX C18 ec, 200 μ l, 5 mg, Macherey-Nagel, France). The column was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water. Immediately after dilution in DMSO, the A β sample was loaded and the column was washed three times with 0.1% TFA. Then, a gradient of acetonitrile from 30 to 60% was applied (Additional file 1). Fractions (0.1 ml) were collected. The elution profile was determined by measuring the absorbance at 275 nm. The peak fraction was collected and the concentration of peptide was determined by absorbance at 275 nm using $\epsilon_{275\text{ nm}} = 1400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. The peptide is then stored at -80 °C.

A β ₀, A β _m, tetrodotoxin (TTX; Latoxan, Valence, France), Ca²⁺-free solution (ACSF - 0 Ca²⁺ - 1 mM EGTA) and HC 030031 (Sigma-Aldrich) were bath applied at the appropriate concentration during 5 min before and during calcium imaging or electrophysiological recordings. Minocycline hydrochloride (Sigma-Aldrich) was bath applied during 15 min before and during calcium imaging recording.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with 10% chloral hydrate and perfused intracardially with 10 ml 0.9% NaCl followed by 35 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.3. Brains were rapidly removed, post-fixed overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde, immersed in 20% sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.5 overnight, frozen in cooled (-35 °C) isopentane and stored at -30 °C. Serial frontal

sections (30 μ m thick) were cut with a cryostat microtome (HM 500 M, Microm, Francheville, France). Sections were blocked by incubation with 3% bovine serum albumin in TBS-Tween-Triton (TBSTT) (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween, 0.1% Triton X-100) for 30 min (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4 °C with either an anti-NeuN antibody (AbCys, France, mouse monoclonal; 1:500), anti-GFAP antibody (Molecular Probes, USA, mouse monoclonal; 1:1000), anti-TRPA1 antibody (Novus, USA, rabbit polyclonal; 1:100) or anti-Iba-1 antibody (Wako, USA, rabbit polyclonal; 1:500). Tissue sections were washed in TBSTT and incubated for 2 h at room temperature with Cyanin 3- (Jackson Immuno Research Laboratories, USA; 1:1000) or Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Life Technology, USA; 1:1000). Sections were washed in TBSTT and mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, USA).

When appropriate, amyloid- β deposits were stained using Thioflavine S [21]. Sections were re-hydrated in TBS buffer (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl), incubated in filtered 1% aqueous Thioflavine S (Sigma, France) for 8 min at room temperature, in the dark and washed several times in TBS buffer.

Image acquisition

Sections were examined with a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope with a Plan Apochromat 20 \times objective (NA 0.8) or an oil immersion Plan Neofluor 40 \times objective (NA 1.3) and translating platform with motorized crossed roller stages. When appropriate, mosaics were acquired for each channel separately with "Zen" software, in a 12-bit format, using the tile scan function. For TRPA1 and GFAP co-staining, sections were also acquired with a Zeiss Airyscan module with an oil immersion Plan Apochromat 63 \times objective (NA 1.46) to improve lateral resolution (~140 nm) and signal-to-noise ratios. For illustration, images were merged with ImageJ software.

Immunoblotting

Dissected hippocampi from 1-month old APP/PS1-21 mice were homogenized in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Samples were maintained at 4 °C during all steps of the experiments. Homogenates were cleared at 1000 x g for 10 min to remove nuclei and large debris. Samples in loading buffer were boiled for 10 min and equal amounts of proteins (20 μ g, quantified by micro-BCA assay (Pierce) in duplicate extracts) were resolved on a 4–20% gradient Bis-Tris polyacrylamide precast stain free gels (Bio-Rad) in denaturing conditions. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) for 30 min at 4 °C. Membranes were

blocked with 3% dry milk in Tris-Buffered Saline (TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween for 1 h at room temperature. Membranes were probed with anti-TRPA1 antibody (Novus, USA; 1:2000) and anti-GFAP antibody (Dako, USA, rabbit polyclonal; 1:100000) diluted in 3% dry milk in 0.1% Tween TBS overnight at 4 °C. Membranes were washed in 0.2% Tween TBS and probed with HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Fab') (Interchim, France; 1:40,000) antibody for 45 min at room temperature. After washes, specific proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL Detection System (Bio-Rad) and the chemidoc system (Bio-Rad). Chemiluminescence signals were normalized to protein loading signals acquired using Stain-free pre-cast gels (Bio-Rad).

Statistical analysis

Data were analyzed using R (the R Project for Statistical Computing) [22]. Comparisons between two groups were conducted with the two-tailed Mann-Whitney test. Kruskal-Wallis test followed by Pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test was used when needed for multiple comparisons. Proportions of hyperactive/active astrocyte and focal/expanded activities were compared with χ^2 -test. Data were expressed as mean \pm SEM accompanied by distribution of experimental points. Graphic significance levels were *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

Results

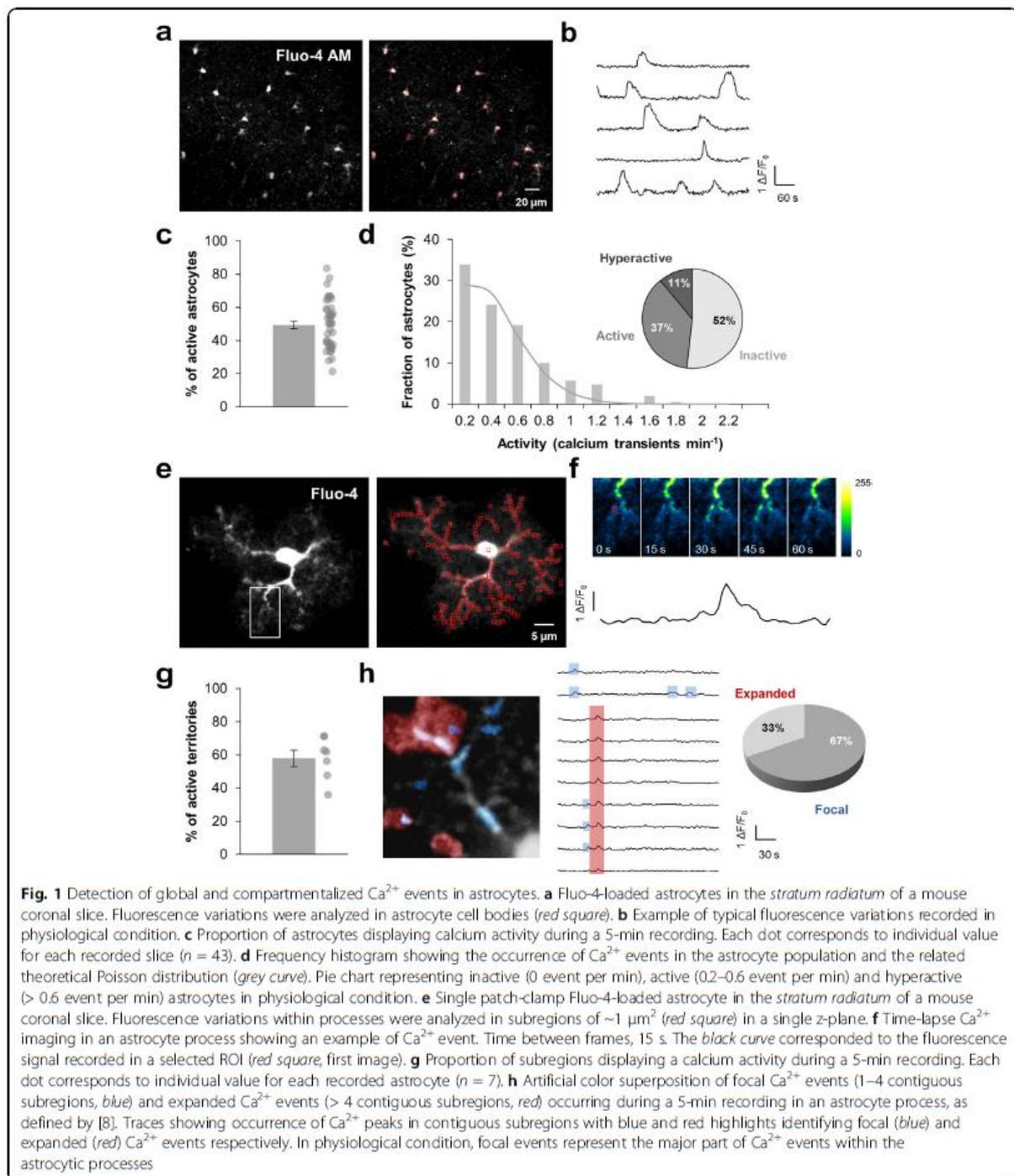
Ca²⁺ activity in the astrocytic population and individual processes in mouse hippocampus

Ca²⁺ signals encoding is known to be different in astrocytic cell body versus processes and involves different calcium sources such as internal stores release or external entry. Spatio-temporal Ca²⁺ activity characteristics within astrocyte correlate to specific function associated with different territories. Astrocytes not only operate as individual cells but also take part in functional network through gap-junction coupling allowing remote communication in delimited functional brain area. We studied astrocytic Ca²⁺ activity at once in the global astrocytic population and in single cell microdomains on mouse hippocampal slices (P17-P23) by using two complementary imaging techniques: i) Fluo-4 AM bulk loading to record calcium activity in the astrocytic population and ii) whole-cell patch-clamp technique to load individual astrocytes with Fluo-4 dye giving access to single cell processes territory (Additional file 2).

We analyzed signals by positioning regions of interest (ROIs) either in each cell body of Fluo-4 AM loaded astrocytes (20.0 \pm 1.3 ROIs by frame; $n = 43$ slices from 14 animals in physiological condition; Fig. 1a, b) or by subdividing the entire patch-clamp loaded territory into subregions of similar area (1 μm^2 ; 111.7 \pm 7.3 ROIs by

astrocyte; $n = 7$ astrocytes from 6 animals in physiological condition; Fig. 1e, f). These subregions corresponded to functional microdomains as previously defined by Di Castro et al. [8] since their size matched approximately the synaptic density in the neuropil region. We investigated some of the temporal properties of astrocytic Ca²⁺ signals (such as the proportion of active cells, the proportion of active microdomains, the frequency of events) and some of the spatial properties of Ca²⁺ signals within the astrocytic arbor (such as the events propagation).

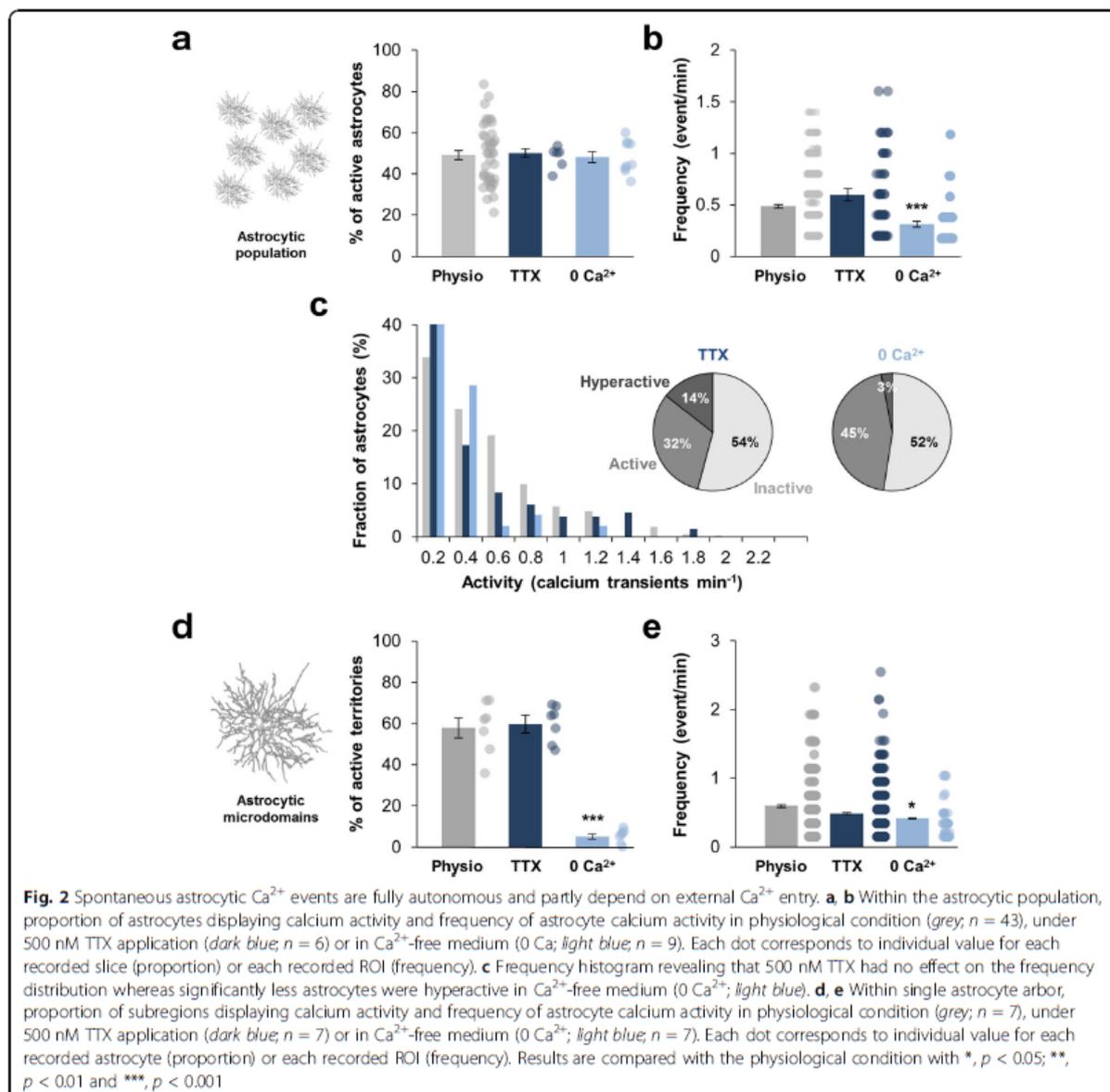
In physiological condition, 49.1 \pm 2.2% of bulk loaded astrocytes were spontaneously active during a 5 min recording period ($n = 43$ slices from 14 animals) with a mean frequency of 0.49 \pm 0.01 event/min ($n = 817$ astrocytes; Fig. 1c). Frequency histograms revealed that the occurrence of Ca²⁺ events in the astrocyte population was similar to a Poisson distribution with $\lambda = 1.85$ suggesting that spontaneous Ca²⁺ event within *stratum radiatum* was a stochastic phenomenon (Fig. 1d). Based on an in vivo study performed in mouse cortical astrocytes [13], we classified astrocytes as inactive (0 event/min), active (0.2–0.6 event/min) and hyperactive (> 0.6 event/min). We observed a minority of hyperactive astrocytes (11%) within mouse hippocampus *stratum radiatum* in physiological condition (Fig. 1d). This spontaneous activity is independent of neuronal activity since TTX (500 nM) had no effect on either the proportion of active astrocytes or the frequency of calcium activity or the proportion of active/hyperactive astrocyte (Fig. 2a–c). This therefore confirmed that the global activity of the astrocytic population is totally autonomous within the mouse hippocampus *stratum radiatum* [18]. In single patch-clamp loaded astrocyte, we had access to Ca²⁺ activity in a two-dimensional acquisition plane representing on average 1945.3 \pm 140.1 μm^2 ($n = 7$ astrocytes; Fig. 1e). We analyzed spatio-temporal encoding of Ca²⁺ signals in 111.7 \pm 7.3 microdomains within the astrocytic arbor. In physiological condition, 57.9 \pm 4.8% of these microdomains were active (i.e. at least 1 Ca²⁺ event; Fig. 1f, g) during a 5 min recording period with a mean activity frequency of 0.59 \pm 0.01 event/min ($n = 782$ ROIs). As previously described in mouse dentate gyrus astrocytes [8], we identified two types of Ca²⁺ events: “focal events” that are confined to 1 to 4 microdomains and “expanded events” appearing in more than 4 contiguous subregions (Fig. 1h). An additional movie file shows these two types of events in more details (Additional file 3). Focal events were the large majority (67%) occurring randomly in all subregions. Expanded events arose less often (33%) and spread over 7.1 \pm 0.4 μm^2 . Within *stratum radiatum*, these two types of Ca²⁺ event were independent of neuronal activity since



TTX application didn't affect either the proportion or the frequency of focal and expanded events (Fig. 2d, e).

Astrocytic Ca^{2+} signaling involves both internal Ca^{2+} stores and external Ca^{2+} entry. Within the *stratum radiatum* astrocyte population, removal of external Ca^{2+}

from the bath (ACSF - 0 Ca^{2+} - EGTA 1 mM) had no effect on the proportion of spontaneously active astrocytes ($48.2 \pm 2.7\%$ in Ca^{2+} -free medium vs $49.1 \pm 2.2\%$ in ACSF; $n = 9$ slices from 5 animals; $p = 0.97$) but aborted approximately 35% of events within active cells



(0.31 ± 0.02 event/min in Ca^{2+} -free medium vs 0.48 ± 0.01 in physiological condition; $n = 103$ astrocytes; $p < 0.0001$) meaning that one third of somatic Ca^{2+} events depended on a Ca^{2+} entry (Fig. 2a–c). Particularly, the proportion of hyperactive/active astrocytes was strongly affected (3% of hyperactive astrocytes versus 11% in physiological condition; $p < 0.001$). Yet, location of internal stores is not uniformly distributed in the astrocytic territory since they are concentrated in cell body and thick processes, thin astrocytic processes being practically devoid of Ca^{2+} stores [23]. Consistently, we observed that removing external Ca^{2+} suppressed nearly all the compartmentalized Ca^{2+} transients in the astrocytic arbor

($5.1 \pm 1.3\%$ active territories vs $57.8 \pm 4.8\%$ in physiological condition; $n = 7$ astrocytes from 6 animals; $p = 0.0006$) and reduced the frequency of the residual signals (0.41 ± 0.01 event/min vs 0.59 ± 0.01 in physiological condition; $n = 687$ ROIs; $p = 0.04$) (Fig. 2d, e).

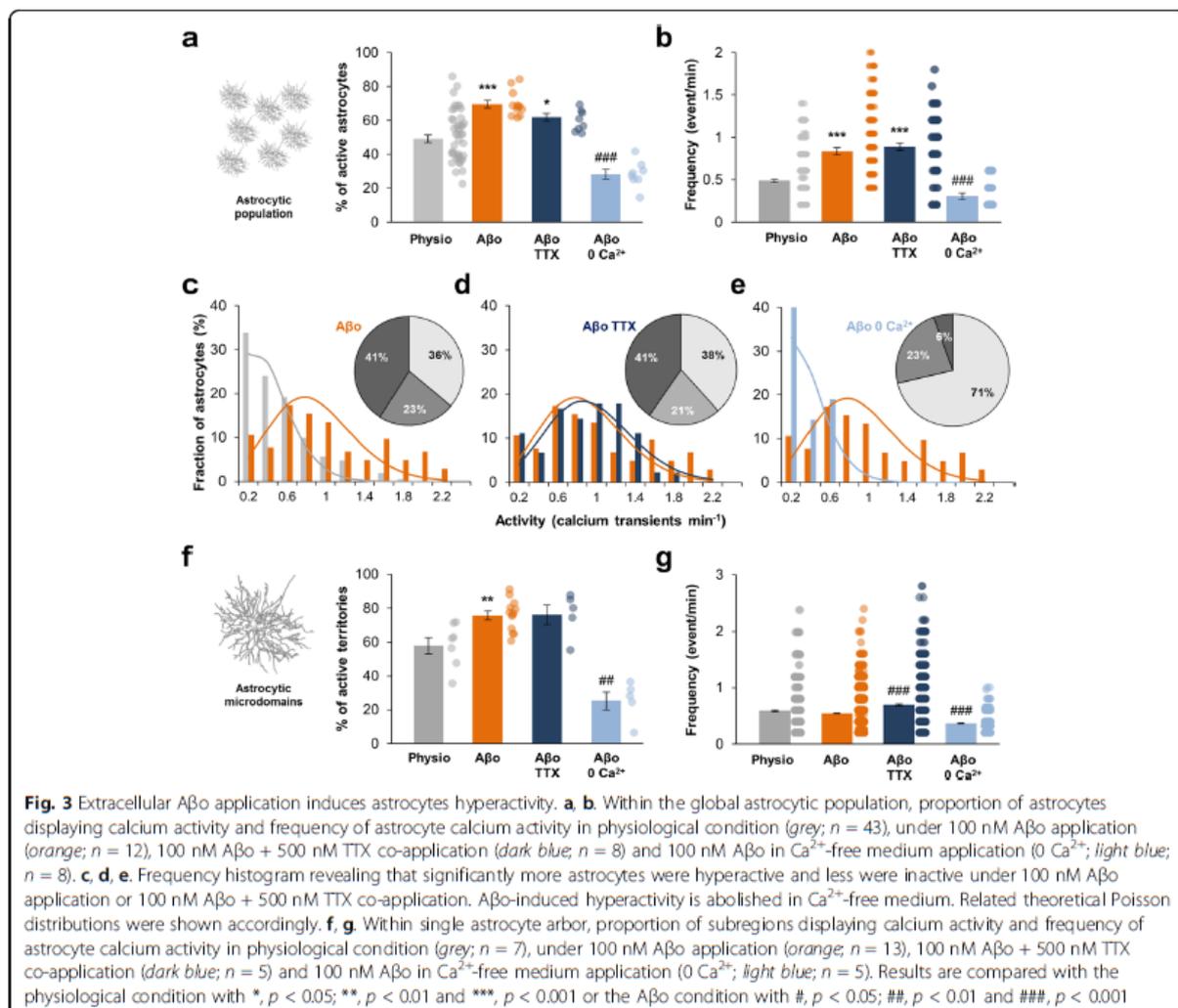
Astrocytes become hyperactive in presence of amyloid- β oligomers

To investigate the effect of soluble $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomers ($\text{A}\beta_0$) on astrocytic calcium signaling, we perfused hippocampal slices with 100 nM of oligomeric forms of the peptide during 5 min before recording. In the global astrocytic population, application of $\text{A}\beta_0$ resulted in a

significant increase in the proportion of active astrocytes ($69.7 \pm 2.1\%$ vs $49.1 \pm 2.2\%$ in physiological condition; $n = 12$ slices; $p < 0.0001$; Fig. 3a). Within active cells, the frequency of Ca^{2+} events also significantly rose (0.83 ± 0.04 event/min vs 0.48 ± 0.01 event/min in physiological condition; $n = 237$ astrocytes; $p < 0.0001$; Fig. 3b). Frequency histogram was switched to high frequency and developed differently from the basal Poisson distribution ($\lambda = 4.39$; Fig. 3c). This suggested that Ca^{2+} event was not anymore a stochastic phenomenon but was managed by $\text{A}\beta$. The fraction of hyperactive astrocyte (i.e. > 0.6 event/min) was significantly larger (41% in $\text{A}\beta$ condition vs 11% in physiological condition; $p = 0.012$; Fig. 3c). Thus, under application of 100 nM $\text{A}\beta$, there is an increase in the population of hyperactive astrocytes at the expense of basal-active and -inactive astrocytes.

In individual patch-clamped astrocyte, application of $\text{A}\beta$ induced a significant increase of the fraction of active territories ($75.8 \pm 2.5\%$ vs $57.9 \pm 4.8\%$ in physiological condition; $n = 13$ astrocytes; $p = 0.0055$; Fig. 3f) with no effect on the frequency of Ca^{2+} events within these microdomains (0.54 ± 0.01 vs 0.59 ± 0.02 event/min; $n = 1806$ ROIs; $p = 0.178$; Fig. 3g). Both focal and expanded event numbers were increased and the ratio of expanded/focal Ca^{2+} events was not significantly affected by $\text{A}\beta$ (41% of expanded events in $\text{A}\beta$ condition vs 33% in physiological condition; $p = 0.27$; Additional file 4a). However, expanded events size significantly increased compared to physiological condition ($9.2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$ vs $7.1 \pm 0.4 \mu\text{m}^2$; $p = 0.045$; Additional file 4c).

Application of monomeric forms of $\text{A}\beta_{1-42}$ ($\text{A}\beta\text{m}$) had no effect on either the proportion of active cells or the Ca^{2+} signal properties within cells confirming that only



oligomeric forms of A β were responsible for this Ca²⁺ hyperactivity ($n = 14$ slices from 4 animals; Additional file 1c). Major oligomers present in our samples were low-molecular weight oligomers (2- to 4- mers; Additional file 1a).

Thus, 100 nM A β triggered astrocytic calcium hyperactivity within the *stratum radiatum* as soon as 5 min in the global astrocytic population, manifested as an increase of the proportion of active cells along with an increase of the frequency of individual Ca²⁺ events. Interestingly, this global hyperactivity went along with a sustained increase of Ca²⁺ activity within astrocytic processes including an increase of the proportion of active microdomains together with an increase of the expanded events size in the astrocytic processes.

A β -induced astrocytic Ca²⁺ hyperactivity is independent of neuronal activity or microglia activation and involves external Ca²⁺ entry

A β could potentially affect directly and/or indirectly Ca²⁺ signaling within astrocytes. In order to ascertain the neuronal part in the astrocyte hyperactivity, we co-applied 500 nM TTX with 100 nM A β . In bulk loading condition, TTX had no effect on the A β -induced astrocytic Ca²⁺ hyperactivity either in the proportion of active astrocytes ($61.9 \pm 2.2\%$; $n = 8$ slices from 6 animals; Fig. 3a) or in the frequency of Ca²⁺ events (0.89 ± 0.04 event/min; $n = 145$ astrocytes; Fig. 3b). The proportion of hyperactive astrocytes was similar ($p = 0.16$) and the frequency distribution was not impacted by TTX application (Fig. 3d). In the same way, in individual patch-clamped astrocyte, the blockade of action potentials with TTX did not affect the A β effect on the proportion of active territories ($n = 5$ astrocytes from 4 animals; $p = 1.0$; Fig. 3f) and on the frequency of Ca²⁺ events ($n = 870$ ROIs; $p = 0.9$; Fig. 3g). The enlarged size of expanded events was not reduced with TTX ($9.0 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$; $p = 0.68$; Additional file 4c). These data suggested that, within 5 min, A β acts directly on astrocyte signaling independently of any neuronal activity.

Activation of microglia can be a relatively early event in the A β mediated pathological process and can in turn activate astroglia cells [24, 25]. In order to assess the role of microglia in the A β -induced astrocytic Ca²⁺ hyperactivity, we pretreated slices with minocycline, an inhibitor of microglia activation [24–26]. Minocycline 50 nM pre-incubated during 15 min did not prevent the ability of A β to trigger astrocytic Ca²⁺ hyperactivity increasing to the same extent the proportion of active astrocytes ($61.0 \pm 3.3\%$; $n = 6$ slices from 4 animals; $p = 0.0043$) and the frequency of Ca²⁺ events (0.79 ± 0.08 event/min; $n = 69$ astrocytes; $p = 0.02$; Additional file 5a). Thus,

within 5 min, A β acts directly on astrocyte signaling independently of any microglia activation.

To investigate the external and/or internal origin of Ca²⁺ implicated in the A β -induced Ca²⁺ hyperactivity, we applied 100 nM A β in Ca²⁺-free ACSF. Within the astrocytic population, we observed a 60% decrease of the proportion of active astrocytes ($28.1 \pm 2.7\%$ active astrocytes in Ca²⁺-free medium versus $69.7 \pm 2.1\%$ in ACSF; $n = 8$ slices from 6 animals; $p = 0.0002$; Fig. 3a). The A β -induced frequency increase of Ca²⁺ events was also strongly reduced in Ca²⁺-free medium (0.30 ± 0.03 event/min; $n = 73$ astrocytes; $p < 0.0001$; Fig. 3b) and the proportion of hyperactive cells strongly declined (6% vs 41%; $p < 0.0001$; Fig. 3e). Within astrocytic processes, removing external Ca²⁺ avoided 1/3 of compartmentalized A β -induced Ca²⁺ hyperactivity ($25.2 \pm 5.2\%$ of active territories; $n = 5$ astrocytes from 4 animals; $p = 0.0016$; Fig. 3f) and strongly reduced the frequency of the remaining signals (0.37 ± 0.01 event/min; $n = 870$ ROIs; $p < 0.0001$; Fig. 3g). The enlarged size of expanded events was however not significantly reduced in Ca²⁺-free medium ($7.7 \pm 0.7 \mu\text{m}^2$; $p = 0.7$; Additional file 4c). Overall, these data suggested that external Ca²⁺ entry is the main source of A β -induced Ca²⁺ hyperactivity in the astrocytic population and in the astrocytic processes, superimposing a new signal encoding.

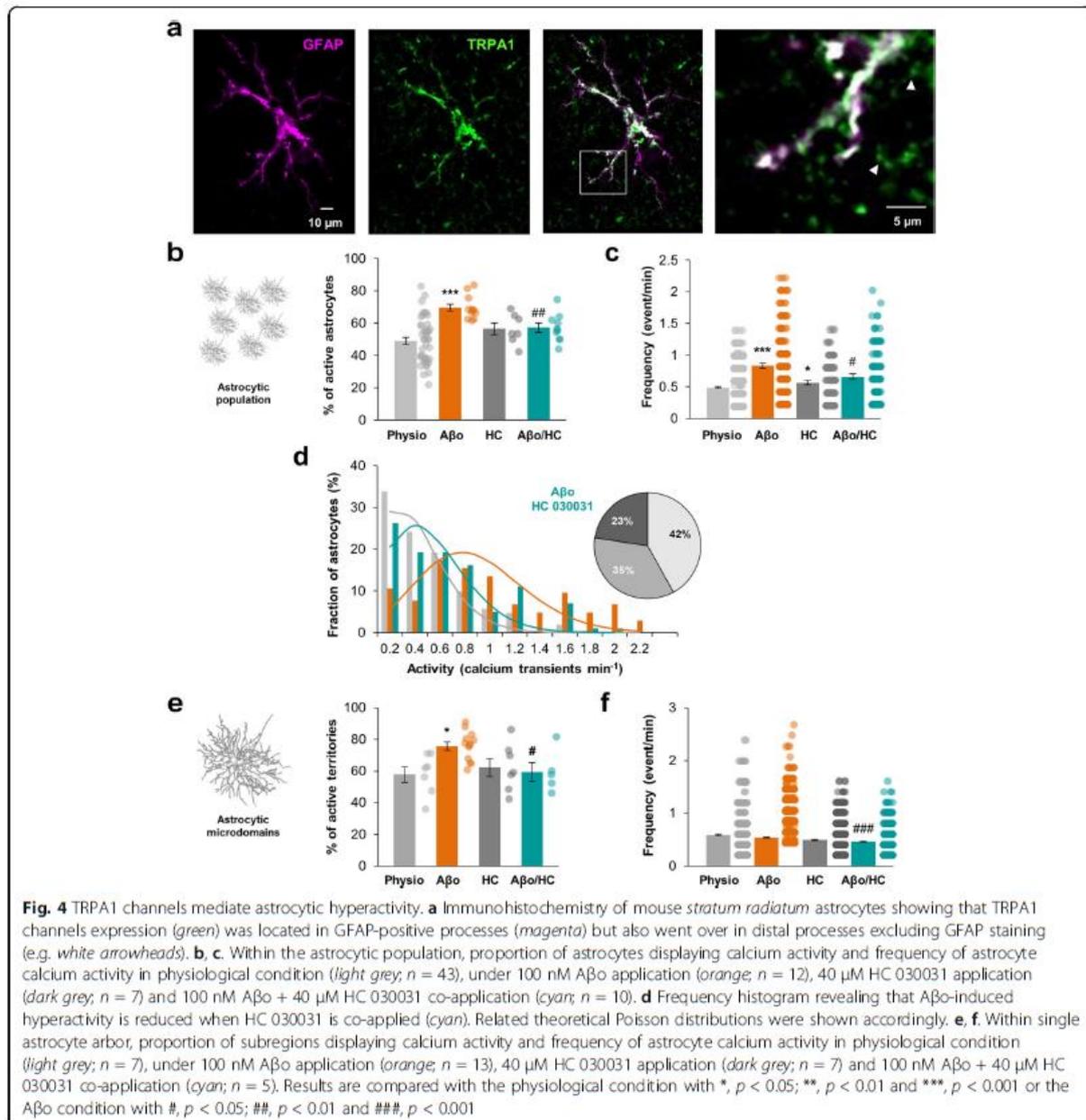
TRPA1 channels underlie Ca²⁺ hyperactivity induced by A β

Within astrocyte, Ca²⁺ entry can occur through astrocytic ligand-gated Ca²⁺ channels (ionotropic receptors), transient receptor potential (TRP) receptors and reverse operation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX). Astrocytic cationic ionotropic receptors (such as AMPA, NMDA or P2X receptors) have relatively low single channel conductance (~ 1 to 3 pS) and accounted for $\sim 4\%$ of fractional Ca²⁺ current [6]. Among TRP receptors, TRPA1 channels have been recently involved in regulating astrocyte basal Ca²⁺ levels in the hippocampus *stratum radiatum* [10, 11]. Interestingly, TRPA1 channels have a relatively high single channel conductance (~ 110 pS) accounting for $\sim 17\%$ of fractional Ca²⁺ current for the constitutively open channel [27] referring them as important actors involved in astrocytic Ca²⁺ entry. Within the CA1 region of mouse hippocampus, functional TRPA1 were only detected in astrocytes [10]. Based on immunohistochemistry of fixed brain sections, we found that TRPA1 channels staining appeared as discrete punctates predominantly co-localized with astrocytes (GFAP-positive cells; Additional file 6). Higher-resolution images showed that TRPA1 channels were expressed in both cell body and thick processes of *stratum radiatum* astrocytes objectivized by the GFAP co-staining. Some staining also appeared in adjacent

territories (Fig. 4a) continuous with GFAP-positive stem processes. An additional 3D-reconstruct movie file shows this in more details (Additional file 7) and suggested that TRPA1 channels were expressed in astrocyte thin processes. These observations agreed with immunogold electron microscopy studies performed in rat trigeminal caudal nucleus showing that TRPA1 channels are localized in astrocyte peripheral processes [28].

In physiological condition, incubation of slices with the selective TRPA1 blocker, HC 030031 (40 μ M) [29], during 5 min had no effect on the proportion of

spontaneous active astrocytes within the global astrocytic population ($56.5 \pm 3.5\%$ active astrocytes; $n = 7$ slices from 3 animals; $p = 0.17$; Fig. 4b) but increased the frequency of Ca^{2+} events (0.56 ± 0.03 event/min; $n = 167$ astrocytes; $p = 0.043$; Fig. 4c). In patch-clamped cells, incubating 5 min slices with 40 μ M HC 030031 had no impact on the proportion of active microdomains ($62.8 \pm 5.7\%$; $n = 7$ astrocytes from 4 animals; $p = 0.71$; Fig. 4e) or on Ca^{2+} signal frequency (0.50 ± 0.01 event/min; $n = 919$ ROIs; $p = 0.19$; Fig. 4f). Together, these data confirmed that TRPA1 does not massively



contribute to spontaneous Ca^{2+} signaling in the astrocytic arbor territory of *stratum radiatum* astrocytes [11, 30].

Interestingly, when $\text{A}\beta_0$ was applied in presence of HC 030031 (40 μM), the astrocytic Ca^{2+} hyperactivity was totally abolished and restored to basal levels either in the global astrocytic population or in the processes territory. In bulk loading condition, the proportion of active astrocytes decreased ($57.1 \pm 2.8\%$ in $\text{A}\beta_0 + \text{HC 030031}$ vs $69.7 \pm 2.1\%$ in $\text{A}\beta_0$ condition; $n = 10$ slices from 3 animals; $p = 0.0021$; Fig. 4b) and was reversed to physiological condition level ($49.1 \pm 2.2\%$; $p = 0.08$). Frequency also decreased when HC 030031 was co-applied with $\text{A}\beta_0$ (0.67 ± 0.04 event/min vs 0.83 ± 0.04 event/min in $\text{A}\beta_0$ condition; $n = 181$ astrocytes; $p = 0.013$; Fig. 4c) but remained higher than in physiological condition (0.49 ± 0.01 event/min; $p = 0.0002$). Frequency distribution tended toward physiological distribution and the proportion of hyperactive astrocytes was reduced (23% in $\text{A}\beta_0 + \text{HC 030031}$ vs 41% in $\text{A}\beta_0$ condition; $p = 0.023$; Fig. 4d). Within individual cells, the proportion of active microdomains declined ($59.4 \pm 6.0\%$ of active microdomains in $\text{A}\beta_0 + \text{HC 030031}$ vs $75.8 \pm 2.5\%$ in $\text{A}\beta_0$ condition; $n = 5$ astrocytes from 4 animals; $p = 0.03$) close to physiological value ($57.9 \pm 4.8\%$; $p = 0.87$; Fig. 4e) together with the events frequency (0.47 ± 0.09 event/min in $\text{A}\beta_0 + \text{HC 030031}$ vs 0.54 ± 0.07 event/min in $\text{A}\beta_0$ condition; $n = 760$ ROIs; $p < 0.0001$; Fig. 4f). The ratio of expanded/focal event decreased (30% of expanded event in $\text{A}\beta_0 + \text{HC 030031}$ vs 41% in $\text{A}\beta_0$ condition; $p = 0.039$; Additional file 4a) reaching physiological value (33%; $p = 0.45$). Expanded surface extension also shrank ($7.2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$ vs $9.2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$; $p = 0.017$; Additional file 4c) close to physiological size ($7.1 \pm 0.4 \mu\text{m}^2$).

Thus, while having a negligible impact on physiological spontaneous Ca^{2+} activity, blocking TRPA1 channels cancelled astrocyte Ca^{2+} hyperactivity induced by $\text{A}\beta_0$ leading most of the spatiotemporal Ca^{2+} signal properties back to physiological state in either the astrocytic arbor microdomains or the global astrocytic population.

APP/PS1–21 mice display early astrocytic hyperactivity that involves TRPA1 channels

APP/PS1–21 mice co-express the human KM/67/671NL mutation in the amyloid precursor protein (APP_{swe}) and the human L166P-mutated presenilin 1 (PS1) under the control of Thy1 promotor. These transgenic mice display high transgene expression with $\text{A}\beta_{1-42}$ levels being significant at 1 month and plaques appearing at 6 weeks of age in the neocortex and at 4–5 months in the CA1 hippocampus [15]. As external application of $\text{A}\beta_0$ induced an immediate astrocytic hyperactivity in hippocampal healthy brain slices, we wonder about the

effect of $\text{A}\beta$ in APP/PS1–21 mice at the beginning of its secretion within the brain. Thy1 is known to be expressed from ~P14 in mouse CA1 hippocampus [31] thus $\text{A}\beta_{1-42}$ might be produced from this stage. However, while being present at this early stage [15], $\text{A}\beta$ were not yet aggregated in plaques in APP/PS1–21 mice at 1-month-old (Fig. 5a) while $\text{A}\beta$ plaques were present in the hippocampus at 6-month-old as testified with Thioflavin S labeling [21]. Likewise, astroglial marker such as GFAP showed a similar profile in WT versus APP/PS1–21 mice at 1-month-old confirming the lack of reactive astrogliosis in these early stages (Fig. 5b, d). Thus, studying astrocyte activity at these early stages allowed us to measure the impact of not aggregated $\text{A}\beta$ on healthy astrocytes in an AD transgenic mice model.

We first investigated the expression of TRPA1 channels in the hippocampus of young APP/PS1–21 mice and their littermates (WT). We found that the protein level of TRPA1 channels was similar in P19 mice ($n = 6$ hippocampus from 3 animals for each; $p = 0.9$; Fig. 5c) and twice higher in P30 APP/PS1–21 than WT mice ($n = 8$ hippocampus from 4 animals for each; $p = 0.02$; Fig. 5c) suggesting an early upregulation of this channel from the onset of $\text{A}\beta$ secretion. At the same time, GFAP protein level was stable (Fig. 5d) testifying the lack of astrogliosis in these early AD stages.

We then recorded astrocytic Ca^{2+} signals in young APP/PS1–21 mice (from P19 to P28) and compared to their littermates (WT). In bulk loaded slices, the proportion of active astrocytes within *stratum radiatum* was similar in both condition ($45.4 \pm 4.1\%$ in APP/PS1–21 vs $47.1 \pm 4.9\%$ in WT; $n = 8$ slices from 5 animals in each condition; $p = 0.8$; Fig. 6a). However, the frequency of Ca^{2+} events was significantly higher in APP/PS1–21 cells (0.65 ± 0.07 event/min in APP/PS1–21 vs 0.33 ± 0.03 event/min in WT; $n = 103$ and 105 astrocytes respectively; $p = 0.0013$; Fig. 6a) and the frequency distribution was switched to higher frequency in APP/PS1–21 compared to WT mice ($\lambda = 2.1$ vs 1.21 in WT; Fig. 6b) leading to an increase of the fraction of hyperactive cells (21% vs 6% in WT; $p = 0.0009$; Fig. 6b).

In this AD mouse model, no signs of neuroinflammation were apparent in 1-month-old mice and microgliosis has been described to be concomitant with plaques appearance [15]. Indeed, at these early stages, microglia phenotype was not different in APP/PS1–21 mice from WT littermate (Iba-1 immunostaining; Additional file 5b). However, to confirm that microglia was not involved in these early astrocytic events, we pretreated slices with minocycline in order to inhibit potential microglia activation [24–26]. Minocycline 50 nM, pre-incubated during 15 min, had no effect on either the proportion of active cells or the frequency of astrocytic Ca^{2+} events within

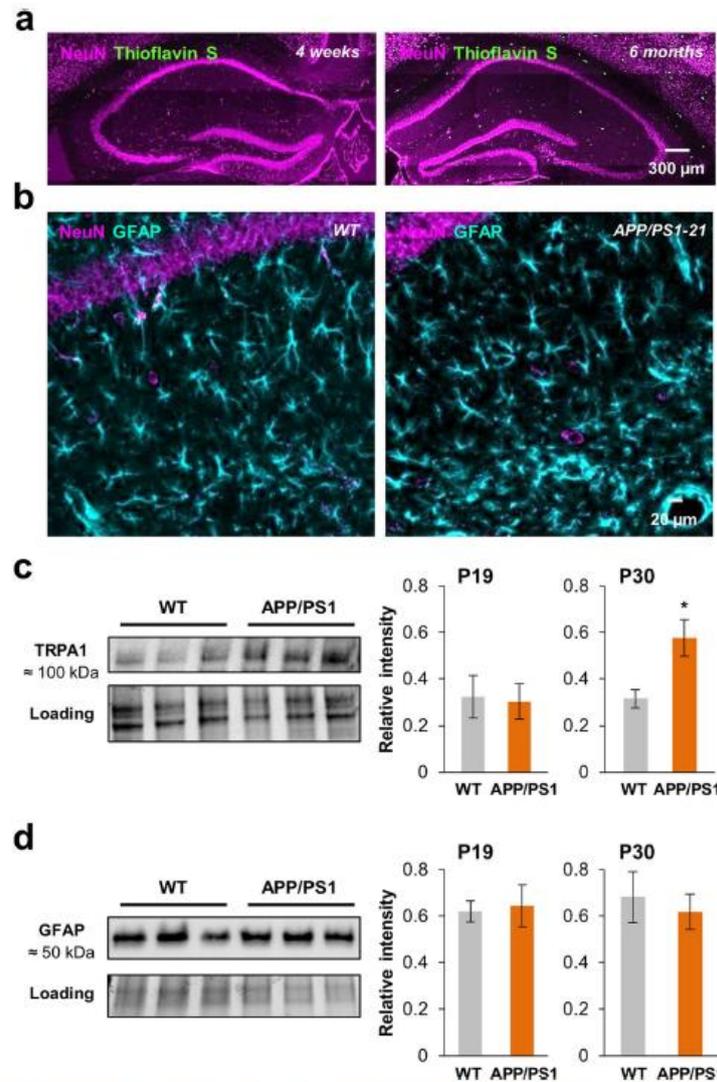
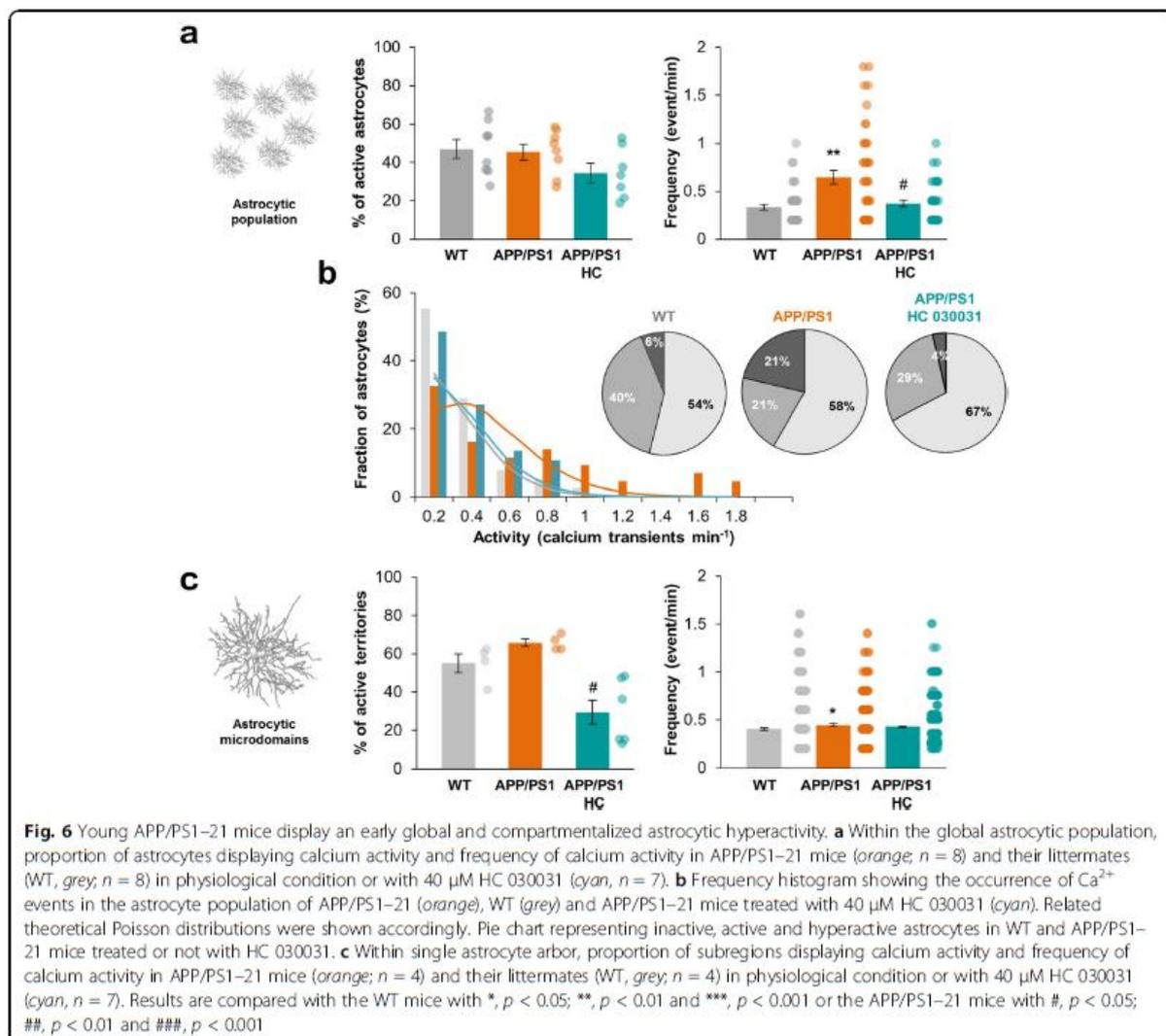


Fig. 5 Young APP/PS1–21 mice are devoid of amyloid deposit and reactive astrocyte whereas gradually overexpress TRPA1. **a** Thioflavin S staining for β -amyloid deposits (green) and NeuN immunostaining (magenta) in the hippocampus of 1-month-old (left) and 6-month-old (right) APP/PS1–21 mice showing the progression of the number of amyloid deposits. **b** GFAP (cyan) and NeuN (magenta) immunostainings in the stratum radiatum of a P30 WT (left) and APP/PS1–21 (right) mice. **c** Western-blot analysis of protein levels of TRPA1 channels in hippocampus extracts from P19 and P30 WT and APP/PS1–21 mice (3 different extracts of P30 WT and APP/PS1–21 mice are shown). Histogram showing quantification of TRPA1 channels expression normalized to protein loading levels ($n = 6$ hippocampus in each group at P19 and 8 hippocampus in each group at P30). **d** Western-blot analysis of protein levels of GFAP in hippocampus extracts from P19 and P30 WT and APP/PS1–21 mice (extracts of same P30 lysates depicted in c are shown). Histogram showing quantification of GFAP expression normalized to protein loading levels ($n = 7$ hippocampus in each group at P19 and P30). Results are compared with the WT mice with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$

APP/PS1–21 mice ($n = 6$ slices from 4 animals; $p = 0.88$ and 0.82 respectively; Additional file 5c) testifying that microglia activation was not involved in the astrocytic hyperactivity setting up at the beginning of $A\beta$ secretion in this AD mouse model. In patch-clamp loaded astrocyte, the proportion of active microdomains increased in APP/PS1–21 mice ($65.7 \pm 2.0\%$ vs $55.0 \pm 4.8\%$ in WT; $n = 4$ astrocytes from 4 animals for each; $p = 0.052$; Fig. 6c)

together with the frequency of events within these microdomains (0.45 ± 0.02 event/min vs 0.40 ± 0.01 event/min in WT; $n = 255$ and 426 ROIs respectively; $p = 0.04$; Fig. 6c). The proportion of expanded/focal events was slightly affected in APP/PS1–21 mice in favor of expanded event and the size of expanded events was similar ($6.8 \pm 0.3 \mu\text{m}^2$ in WT vs $6.7 \pm 0.3 \mu\text{m}^2$ in APP/PS1–21; $p = 0.42$; Additional



file 4b, d). Thus, in young APP/PS1-21 mice, Ca^{2+} activity in the global astrocytic population and the compartmentalized activity within the astrocytic arbor started to be affected from the beginning of $\text{A}\beta$ overproduction.

In these conditions, blocking TRPA1 channels with HC 030031 (40 μM) in APP/PS1-21 mice strongly decreased the frequency of Ca^{2+} events (0.37 ± 0.03 event/min with HC 030031 vs 0.64 ± 0.07 ; $n = 113$ astrocytes from 7 slices; $p = 0.013$; Fig. 6a) resulting in a clear redistribution of Ca^{2+} events frequency ($\lambda = 1.35$) and a decrease of the proportion of hyperactive cells that look alike the WT situation (4% in APP/PS1-21 + HC 030031 vs 21% in APP/PS1-21; $p = 0.0025$; Fig. 6b). In patch-clamp loaded astrocyte, HC 030031 induced a significant decrease of the proportion of active microdomains in APP/PS1-21 mice ($29.3 \pm 6.2\%$; $n = 7$ from 4

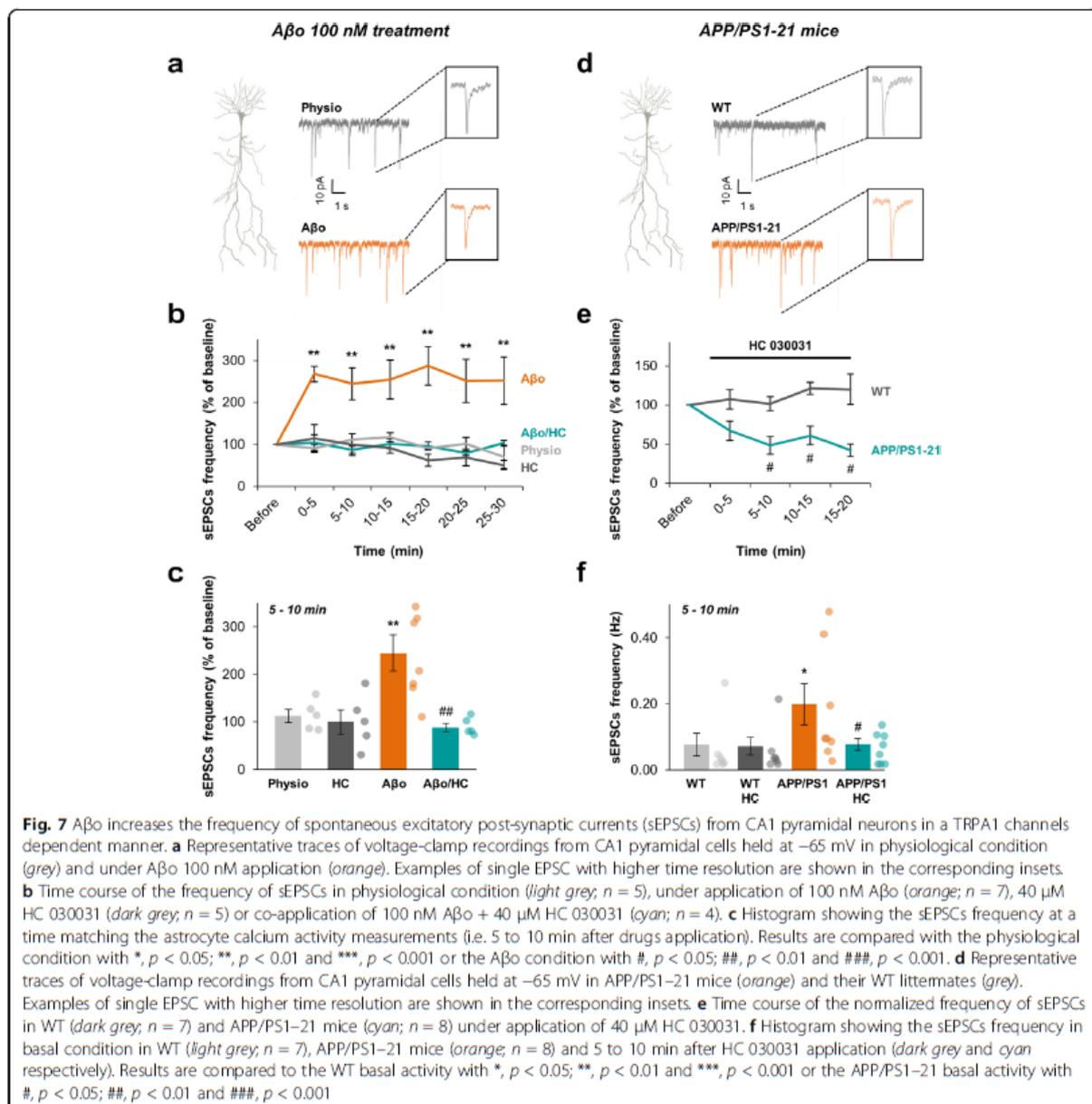
animals; $p = 0.01$; Fig. 6c) together with a restrained effect on the frequency (0.43 ± 0.06 event/min; $n = 1213$ and 1577 ROIs respectively; $p = 0.058$). The proportion of expanded/focal events was also reduced with HC 030031 treatment (Additional file 4b). Overall, these observations in young APP/PS1-21 mice matched the above related effect of $\text{A}\beta$ application in healthy slices consistently with a TRPA1 channel involvement. Merely, they were more subtle and initially restrained to the astrocytic arbor.

$\text{A}\beta$ -induced CA1 neurons hyperactivity is related to TRPA1 channels activation

Astrocytes are known to actively regulate synaptic activity and plasticity [4]. Given the time range of the $\text{A}\beta$ -mediated impact on astrocyte excitability, we wonder about its consequences on basal synaptic activity. Thus,

to explore the outcome of A β induced TRPA1-dependent astrocyte hyperexcitability on neighboring synapses, we recorded CA1 pyramidal neurons spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) performing whole-cell patch-clamp recordings on CA1 neurons cell bodies (Fig. 7a). The initial mean frequency of sEPSCs recorded from CA1 pyramidal neurons was 0.13 ± 0.03 Hz ($n = 22$ neurons from 17 animals) and was stable during a 30-min recording (Fig. 7b). The mean peak amplitude of sEPSCs recorded from CA1 pyramidal neurons was 31.1 ± 2.0 pA. Interestingly, application of 40 μ M HC 030031 alone had no effect on

sEPSCs frequency ($74 \pm 22\%$ from 5 to 10 min; $n = 5$ cells from 3 animals; $p = 0.6$; Fig. 7b, c) suggesting that TRPA1 channels were not involved in physiological sEPSCs modulation. Application of 100 nM A β in the extracellular medium induced a rapid, strong and persistent increase of sEPSCs frequency (Fig. 7b; $n = 7$ cells from 6 animals) with no effect on the sEPSCs amplitude (32.4 ± 2.5 pA; $p = 0.3$). We confirmed that application of monomeric forms of A β_{1-42} (A β m) had no effect on sEPSCs frequency during the 30-min recording ($n = 5$; $p = 0.78$; Additional file 1d) settling that only oligomeric forms of A β_{1-42} were active. Interestingly, the strong



and persistent increase of sEPSCs frequency induced by A β was time-concomitant with the setting up of astrocyte hyperexcitability (i.e. 5 to 10 min, $245 \pm 38\%$; $p = 0.01$; Fig. 7c) and was fully abolished by a co-application of HC 030031 (40 μ M) with A β ($88 \pm 8\%$ from 5 to 10 min; $n = 5$ cells from 5 animals; $p = 0.005$; Fig. 7b, c). This suggests that TRPA1 channels-dependent astrocyte hyperactivity induced by A β directly influenced CA1 neurons activity and its blockade was enough to counteract the neuronal hyperactivity, at least in the short and medium term.

We then recorded spontaneous EPSCs in APP/PS1–21 mice at the onset of A β overproduction (P20–P28) and compared to their littermates (WT). We observed an increase of CA1 neurons sEPSCs frequency setting up at P20 in APP/PS1–21 mice (0.20 ± 0.06 Hz in APP/PS1–21 vs 0.08 ± 0.03 Hz in WT; $n = 8$ neurons from 6 animals in APP/PS1–21 and 7 neurons from 5 animals in WT; $p = 0.0271$; Fig. 7d, f) with no difference in their amplitude (33.7 ± 1.9 pA in APP/PS1–21 vs 33.0 ± 2.3 pA in WT; $p = 0.955$). These data confirmed that neuronal hyperexcitability is one of the earliest dysfunction in the pathophysiological cascade initiated by abnormal A β accumulation [32]. Application of HC 030031 (40 μ M) strongly reduced sEPSCs frequency in APP/PS1–21 mice as soon as 5 min after its bath perfusion (0.08 ± 0.02 Hz; $n = 8$ neurons from 6 animals; $p = 0.0234$) while it had no effect on WT mice (0.07 ± 0.03 Hz; $n = 7$ neurons from 5 animals; $p = 0.854$; Fig. 7e, f). These data corroborate the highlighted precocious involvement of TRPA1 channel in AD pathogenesis.

Discussion

In this study, we investigated the contribution of astrocytes in early A β toxicity by studying calcium signaling in different parts of the whole astrocyte territory. We found that astroglia is a frontline target of A β exhibiting a global and local Ca $^{2+}$ hyperactivity that involves TRPA1 channels. This TRPA1 channel-dependent astrocytic Ca $^{2+}$ hyperactivity exerts regulatory influences on synaptic function and is linked to the glutamatergic synapse hyperactivity recorded in CA1 neurons. Concurrently to these acute A β -induced effects, astrocytes in young APP/PS1–21 mice hippocampus elicit a similar pattern of calcium hyperactivity in close relationship with the setting up of a precocious neuronal hyperactivity that are both reversed when TRPA1 channel is blocked. Moreover, the TRPA1 channel is gradually overexpressed at the onset of A β production in this AD mouse model.

Intracellular Ca $^{2+}$ transients are considered as the primary signal by which astrocytes interact with each other and with neighboring neurons. Ca $^{2+}$ has been extensively

studied within the astrocytic cell body and thick branches. More recently, local Ca $^{2+}$ dynamics in distal fine processes has been investigated emphasizing a highly compartmentalized signaling, interconnected with physiological transmission at neighboring synapses [8, 9]. Compartmentalization of astrocytic Ca $^{2+}$ dynamics needs to be attentively considered in order to understand how astrocytes may contribute to brain information processing [8]. We thus chose to study both levels of information (i.e. global population signaling and local microdomain signaling) combining bulk loading and single cell astrocyte loading. Genetically encoded Ca $^{2+}$ indicators (GECIs) have been recently used to study Ca $^{2+}$ signals in distal thin processes [9]. Alternatively, patch pipette loading give access to the whole territory of a single astrocyte and, currently, Fluo-4 is far more sensitive than GECIs therefore enabling to track smaller signals [8]. Accordingly, we observed a similar and even better diffusion of Fluo-4 in a single astrocyte compared to SR101. We first characterized the physiological calcium activity of mouse CA1 *stratum radiatum* astrocytes and showed that this activity is fully autonomous, i.e. independent of neuronal activity, both at the astrocytic population level and at the microdomain level. This is in agreement with data obtained in mouse CA1 hippocampus [30, 33] but not with astrocyte behavior in the dentate gyrus where expanded Ca $^{2+}$ events were partly dependent on neuronal activity [8]. Interestingly, external Ca $^{2+}$ entry is the main source of Ca $^{2+}$ within thin processes whereas it only partly contributes to somatic signaling. This discrepancy between Ca $^{2+}$ sources in astrocyte soma and distal processes has already been described in brain slices [34]. This might be supported by the subcellular location of calcium stores that are concentrated in the cell body and thick processes but are almost absent from thin processes [23].

A central element of the pathogenesis of AD is the progressive accumulation of A β species, ultimately resulting in the formation of plaques. Yet, small soluble A β oligomers are sufficient to induce several features of the AD phenotype [1]. The paths by which A β leads to neurodegeneration are probably multifactorial but all converge all towards synaptic dysfunction. The major challenge of AD research is to understand the complex cellular reaction underlying the long prodromal phase of AD [14]. Astrocytes are an integral part of synaptic transmission and are therefore critical for the establishment and maintenance of neuronal health [5]. They contribute to neuronal dysfunction by being proinflammatory [35] but also play a protective role, e.g. through the release of gliotransmitters [36] and A β clearance [37, 38]. It is therefore of major importance to distinguish the beneficial

from the deleterious impact of A β on astrocyte function. A β has already been involved as a direct effector on astrocytes in primary cultures [39], in hippocampal slices [40] and in vivo [12] but here we showed a peculiar rapid action on compartmentalized calcium activity, activating a membrane Ca $^{2+}$ permeable channel. Indeed, A β application triggers global Ca $^{2+}$ hyperactivity in CA1 hippocampus astroglial population together with an intensification of the compartmentalized Ca $^{2+}$ activity in the astrocytic processes and a spatial extension of the size of the expanded Ca $^{2+}$ events within microdomains. These effects are specific to oligomeric forms of A β since application of the monomeric form in the same conditions had no impact on astrocytic calcium activity. We reported that the effect of A β on astrocyte excitability is fully independent of neuronal activity since TTX application does not prevent the A β effect neither on the global hyperactivity nor on the compartmentalized hyperactivity in processes. Concurrently, microglia activation does not participate in this astrocytic hyperactivity, at least in the time scale studied, whereas longer applications of A β activate microglia together with astroglia [24]. Thus, astrocytes seem to express a distinctive precocious detector involved at the onset of A β appearance. Removal of external Ca $^{2+}$ largely inhibits A β -induced astrocyte hyperactivity at the population level while it has no effect in physiological conditions. Removal of external Ca $^{2+}$ also inhibits the majority of the compartmentalized A β -induced hyperactivity. Thus, transmembrane Ca $^{2+}$ entry carries most of the A β -induced hyperactivity. Remarkably, we showed that both global and compartmentalized hyperactivities are driven by TRPA1-dependent Ca $^{2+}$ entry since HC 030031, a specific TRPA1 channel inhibitor [29], strongly abolishes A β -induced astrocyte hyperexcitability and totally restores the spatiotemporal properties of Ca $^{2+}$ events back to a physiological level.

The TRPA1 channel is a Ca $^{2+}$ permeable non-selective cation channel initially known to be expressed in primary afferent nociceptive neurons [29]. In mouse CA1 hippocampus, TRPA1 channels are found to be preferentially expressed in astrocytes [10]. However, their involvement in physiological astrocytic Ca $^{2+}$ signaling is highly debated. It has been shown that TRPA1 channels contribute to maintain basal Ca $^{2+}$ levels and regulate ~20% of spontaneous Ca $^{2+}$ signals within astrocyte branches [11] but in the end, poorly take part in basal astrocytic Ca $^{2+}$ signaling [30, 33]. Our data assume that TRPA1 channels are only slightly involved in the astrocytic Ca $^{2+}$ signaling in physiological conditions. However, we highlighted they are quickly and largely involved in case of A β presence. The absence of an obvious involvement of these channels in astrocyte physiological Ca $^{2+}$ signaling is startling since we evidenced a TRPA1 channel expression in thick and in adjacent thin

astrocytic processes. Thus, TRPA1 channels might only behave as an "aggression sensor". Indeed, TRPA1 channel gating is particularly regulated by numerous electrophilic activators - such as reactive oxygen species, reactive nitrogen species or oxidized lipids - and also functions as a mechanosensor [27]. Hence, TRPA1 channels might be directly targeted by A β or might be secondarily activated through an A β -induced oxidative stress and/or through its mechanosensor properties if A β binds to the astrocytic cholesterol-rich plasma membrane [14].

Strikingly, in young APP/PS1-21 mice (~3-4 weeks), we observed a similar pattern of astrocytic hyperactivity starting at the beginning of A β overproduction in the hippocampus, long before its aggregation into plaques. These early repercussions in young APP/PS1-21 mice were restricted to the frequency of astrocytic Ca $^{2+}$ events in either the astrocytic population and microdomains of astrocytic processes with fewer impacts on the proportion of active cells or microdomains. This suggests a gradual impact of surrounding A β on astrocyte signaling, increasing the frequency of compartmentalized Ca $^{2+}$ events and, to a lesser extent, the proportion of active territories within the astrocytic processes. These impacts on astrocytic processes go along with a noteworthy redistribution of the frequency of Ca $^{2+}$ events within the astrocytic population. Interestingly, blockade of TRPA1 channels with HC 030031 abolished the astrocyte Ca $^{2+}$ hyperactivity. Overall, TRPA1 channel signaling seems to be at the frontline in mediating these A β progressive effects in early stages of AD. Data obtained in an advanced AD transgenic model showed an astrocyte network hyperactivity in cortical areas close to A β plaques and an involvement of metabotropic purinergic signaling in this astrocyte hyperactivity [13]. This suggests a differential evolution of astrocyte engagement in AD pathogenesis depending on the stage, the structure and the physiopathological state of the astrocyte. Likewise, it has been reported that the TRPA1 channels' protein level was increased in hippocampal astrocytes of 8 month-old APP/PS1 mice at where it mediated inflammation through astrocyte activation [41]. Here, we showed that TRPA1 channel expression in hippocampus is increased much earlier, as soon as 1 month of age, in a more aggressive AD mouse model (APP/PS1-21). These data point towards a TRPA1 channel contribution in early stages of pathophysiology, that is as soon as the A β level increases and long before the setting up of astrogliosis or inflammatory mechanisms.

Numerous laboratory studies in the past decade have shown that A β impairs synaptic function and synaptic structure [42]. However, how soluble A β initiates these effects remains to be determined. Each astrocyte deploys many fine processes to contact up to 140,000 synapses in the CA1 region [43]. As we highlighted an intense

and early effect of A β on astrocyte Ca²⁺ activity within processes, we assessed the link with spontaneous neuronal activity. Indeed A β is also known to enhance spontaneous neuronal excitability in CA1 [32, 44, 45]. Consistently, we showed here that A β induces a rapid and strong increase of spontaneous EPSCs frequency in CA1 neurons. Strikingly, blocking TRPA1 channels totally prevents this A β neuronal impact. Yet, when we blocked neuronal activity with TTX, we did not affect the A β -induced astrocyte hyperactivity which would be partly the case if a neuronal TRPA1 was involved. This precocious A β impact thus seems to trigger a one-way communication from astrocyte to neuron related to TRPA1 activation. This TRPA1-dependent neuronal hyperactivity was similarly observed in APP/PS1-21 mice at the onset of A β overproduction testifying its physiopathological relevance in the AD initiation process. It has been shown that A β can increase astrocytic release of glutamate to the extrasynaptic space resulting in the activation of extrasynaptic NMDARs and the disruption of neuronal signaling [40, 46, 47]. Besides, astrocytes can regulate synaptic and extrasynaptic neurotransmitter concentrations, such as glutamate, in a Ca²⁺-dependent manner e.g. via vesicular release, bidirectional transport or hemichannel opening [48]. We will further decipher pathways implemented by the A β -induced TRPA1-mediated Ca²⁺ entry that consequently affect neuronal transmission.

It has been demonstrated that soluble A β can affect astrocyte signaling properties in various ways in mouse hippocampal CA1 astrocytes [40, 49, 50]. To some extent, the involvement of TRPA1 channels superimposed to these effects, directly affecting local synaptic function in a distinctive precocious manner. This actor might thus contribute to the complex cellular phase of AD, upstream of symptomatic neurodegeneration [14].

Conclusions

In this work, we have shown that intricate global and compartmentalized astroglial Ca²⁺ signaling disturbances induced by A β are mediated by a TRPA1 channel-dependent Ca²⁺ signaling. This new highlighted mechanism is at work with both external supply of A β and at the onset of A β production in an AD transgenic mouse model. This astrocytic pathway is promptly implemented and involved in the well-known and characteristic A β -induced synaptic dysfunction. Blockade of TRPA1 channel, that appears to be preferentially expressed in astrocytes within the hippocampus [11], is sufficient to counteract the impact of A β on spontaneous neuronal activity. This suggests that astrocytes can be considered as a particularly precocious target in A β toxicity consequently affecting nearby synapses. Up until now, altered astrocyte activation was usually associated with late AD,

i.e. when amyloid plaques are already developed, and the role of astrocytes in the initial toxic effect of A β was not yet evidenced. One of the major findings of our study is to suggest that astrocytes are implicated far before astrogliosis and inflammatory processes. Thus, focusing on this astrocyte involvement, for instance by modulating TRPA1 channel activity, may represent a novel target to hamper early dysfunction in AD.

Additional files

Additional file 1: Characterization and effects of A β oligomers and purified monomers. **(a)** SDS-PAGE analysis of A β oligomers examined by western-blot with 4G8 antibody. A β showed faintly monomers and abundant dimers and trimers. **(b)** SDS-PAGE analysis of A β monomers after purification on C18 column. All fractions were electrophoresed on 15% tris-glycine gel. A β monomer is mainly eluted at 30% acetonitrile. S, sample loaded; FT, flow through; peptides eluted at 30, 40, 50 and 60% acetonitrile. **(c)** Within the astrocytic population, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological condition (grey; n = 43), under 100 nM A β application (orange; n = 12) and under 100 nM A β m application (light orange; n = 7). **(d)** Time course and histogram at 5–10 min of the frequency of sEPSCs in physiological condition (grey; n = 5), under application of 100 nM A β (orange; n = 7) or 100 nM A β m (light orange; n = 5). In any case, A β m was obtained from the 30% acetonitrile fraction purified in b. (TIFF 291 kb)

Additional file 2: Characterization of Fluo-4-loaded cells in the *stratum radiatum* of mouse coronal slice. **(a)** Confocal image of Fluo-4-loaded (cyan) and SR101-labeled (magenta) cells in the CA1 *stratum radiatum*. Merged image showing the proportion of loaded astrocytes (white), confirming that most of the loaded cells are astrocytes. One hour before slicing, animals were iv injected with SR101 as described previously [51]. Vessels are only labeled with SR101 (white arrow). **(b)** Z-stack projections of confocal images of a patched astrocyte loaded with Fluo-4 (cyan) and SR101 (magenta). Merged image showing the Fluo-4 diffusion in the whole astrocytic territory. **(c)** Example of a passive whole-cell current recorded in a *stratum radiatum* astrocyte. Cell was held at -70 mV and 10 mV hyper- and depolarizing voltage steps of 80 ms duration were applied (-110 to +80 mV). (TIFF 1907 kb)

Additional file 3: Expanded and focal Ca²⁺ events in astrocytic processes. Time-lapse imaging of calcium activity in Fluo-4 loaded astrocytic processes in a 5-min recording. Focal and expanded events were pseudo-colored in blue and red respectively (left panel). Raw data were shown in the right panel. (MP4 10286 kb)

Additional file 4: Spatial properties of compartmentalized calcium events in the astrocytic processes. **(a)** Proportion of expanded/focal events in physiological condition, under 100 nM A β application, 100 nM A β + 500 nM TTX co-application and 100 nM A β + 40 μ M HC 030031 co-application. **(b)** Proportion of expanded/focal events in APP/PS1-21 mice and their littermates (WT) in physiological condition or under 40 μ M HC 030031 treatment. **(c)** Mean size of expanded Ca²⁺ events in physiological condition (grey), under 100 nM A β application (orange), 100 nM A β + 500 nM TTX co-application (dark blue), 40 μ M HC 030031 (dark grey), 100 nM A β in Ca²⁺-free medium application (0 Ca; light blue) and 100 nM A β + 40 μ M HC 030031 co-application (cyan). **(d)** Mean size of expanded Ca²⁺ events in APP/PS1-21 mice (orange) and their littermates (WT, light grey) in physiological condition or with 40 μ M HC 030031 treatment (WT, dark grey and APP/PS1-21, cyan). Results are compared with the physiological condition with *, p < 0.05; **, p < 0.01 and ***, p < 0.001 or the A β condition with #, p < 0.05; ##, p < 0.01 and ###, p < 0.001. (TIFF 752 kb)

Additional file 5: Blockade of microglia activation with minocycline does not prevent the effect of A β on astrocyte Ca²⁺ activity. **(a)** Within the astrocytic population, proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in physiological

condition (grey; $n = 43$), under 50 nM minocycline (dark grey; $n = 5$); 100 nM A β application (orange; $n = 12$) and under 50 nM minocycline +100 nM A β application (dark orange; $n = 6$). **(b)** Immunohistochemistry of mouse *stratum radiatum* microglia showing that Iba1-positive cells were not hypertrophic in one-month-old APP/PS1-21 mice when compared to WT littermates. Higher magnification of representative microglia is shown in the lower panels. **(c)** Proportion of astrocytes displaying calcium activity and frequency of astrocyte calcium activity in APP/PS1-21 mice (orange; $n = 8$), under 50 nM minocycline application (dark orange; $n = 6$) or in WT littermates (grey; $n = 8$). Minocycline is pre-incubated 15 min before recording. Results are compared with the physiological condition, with or without minocycline, or with the WT littermates with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$. (TIFF 1680 kb)

Additional file 6: TRPA1 is expressed in *stratum radiatum* astrocyte cell body and processes. **(a)** Immunohistochemistry of mouse *stratum radiatum* astrocytes showing that TRPA1 channels (green) are expressed within astrocytic domains certified by GFAP staining (magenta). **(b)** Merge image showing that most TRPA1 staining co-localized and surrounded GFAP-positive processes. (TIFF 2786 kb)

Additional file 7: TRPA1 channels expression is located in thick GFAP-positive processes and in adjacent thin processes lacking GFAP staining. 3D-reconstruct of astrocytic processes objectivized by GFAP staining (magenta) showing that TRPA1 channels (green) expression went over in contiguous processes excluding GFAP staining. Scale bar: 50 nm. (MP4 25.2 mb)

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; APP: Amyloid Precursor Protein; A β : Amyloid- β peptide; A β m: Amyloid- β monomers; A β o: Amyloid- β oligomers; Ca²⁺: calcium; CA1: Cornu Ammonis 1; GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein; PS1: Presenilin 1; ROI: Regions Of Interest; sEPSC: spontaneous Excitatory PostSynaptic Current; TRPA1: Transient Receptor Potential A1 channel; TTX: tetrodotoxin

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Fabien Mehr and Flore Rimet for their technical assistance in animal perfusion, Rebecca Powell for correcting the english, Yasmina Saoudi for her technical assistance in AlysScan image acquisition on PIC-GIN platform of Grenoble Institut des Neurosciences, Dr. Jean-Claude Platel and Dr. Elodie Fino for stimulating scientific discussions.

Funding

This work was supported by INSERM and University Grenoble Alpes.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this article are included in this published article and its additional information files.

Authors' contributions

ABO performed the calcium imaging experiments. AP carried out the electrophysiological experiments and contributed to some calcium imaging experiments. SB performed the immunoblotting and immunohistochemistry experiments. MJ-S carried out purification of A β monomeric forms. ABO, ABO and MA designed the experiments. ABO, AP, SB and MA analyzed the data. ABO and MA wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages. All authors read and approved the final manuscript.

Author's information

Not applicable.

Ethics approval

All experiments were carried out in accordance with the European Community Council directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) and with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee".

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 17 February 2017 Accepted: 29 June 2017

Published online: 06 July 2017

References

- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:101–12.
- Verkhatsky A, Steinhauser C. Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;32:380–412.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, et al. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*. 2006;125:775–84.
- Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:185–93.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 1999;22:208–15.
- Verkhatsky A, Reyes RC, Parpura V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2014;166:1–22.
- Haustein MD, Kracun S, Lu X-H, Shih T, Jackson-Weaver O, Tong X, et al. Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*. 2014;82:413–29.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, et al. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci*. 2011;14:1276–84.
- Shigetomi E, Bushong EA, Haustein MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, et al. Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol*. 2013;141:633–47.
- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci*. 2012;15:70–80.
- Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT, O'Dell TJ, Khakh BS. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J Neurosci*. 2013;33:10143–53.
- Kuchibhotla K V, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* (80-). 2009;323:1211–5.
- Delekatte A, Fuchtemeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddis M, Petzold GC. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun*. 2014;5:5422.
- De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell*. 2016;164:603–15.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. 2006;7:940–6.
- Barat E, Boisseau S, Bouysières C, Appaix F, Savasta M, Albrieux M. Subthalamic nucleus electrical stimulation modulates calcium activity of nigral astrocytes. *PLoS One*. 2012;7:e41793.
- Reeves AM, Shigetomi E, Khakh BS. Bulk loading of calcium indicator dyes to study astrocyte physiology: key limitations and improvements using morphological maps. *J Neurosci*. 2011;31:9353–8.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol*. 2002;87:528–37.
- Platel J-C, Dupuis A, Boisseau S, Villaz M, Albrieux M, Brocard J. Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci*. 2007;25:920–8.
- Stine WB, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278:11612–22.
- Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res*. 2001;894:21–30.

22. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2008). ISBN 3-900051-07-0. <https://www.r-project.org/>.
23. Patrushev I, Gavrilov N, Turlapov V, Semyanov A. Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication. *Cell Calcium*. 2013;54:343-9.
24. Orellana JA, Shoji KF, Abudara V, Ezan P, Amigou E, Sáez PJ, et al. Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J Neurosci*. 2011;31:4962-77.
25. Abudara V, Roux L, Dall'érac G, Matias I, Dulong J, Mothet JP, et al. Activated microglia impairs neuroglial interaction by opening Cx43 hemichannels in hippocampal astrocytes. *Glia*. 2015;63:795-811.
26. Familian A, Boshuizen RS, Eikelenboom P, Veerhuis R. Inhibitory effect of minocycline on amyloid β fibril formation and human microglial activation. *Glia*. 2006;53:233-40.
27. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Arch Eur J Physiol*. 2012;464:425-58.
28. Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, Noguchi K, et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J Chem Neuroanat*. 2012;45:45-9.
29. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13525-30.
30. Rungta RL, Bernier L-P, Dissing-Olesen L, Groten CJ, LeDue JM, Ko R, et al. Ca²⁺ transients in astrocyte fine processes occur via Ca²⁺ influx in the adult mouse hippocampus. *Glia*. 2016;
31. Porrero C, Rubio-Garrido P, Avedaño C, Clascá F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res*. 2010;1345:59-72.
32. Busche MA, Konnerth A. Neuronal hyperactivity - a key defect in Alzheimer's disease? *BioEssays*. 2015;37:624-32.
33. Nakayama R, Sasaki T, Tanaka KF, Ikegaya Y. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. *Eur J Neurosci*. 2016;43:923-32.
34. Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, Johnston AD, Chai H, Zeng H, et al. Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2*^{-/-} mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci*. 2015;18:708-17.
35. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AHP, Kooijman L, Bossers K, et al. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging*. 2014;35:2746-60.
36. Jung ES, An K, Hong HS, Kim J-H, Mook-Jung I. Astrocyte-originated ATP protects A β (1-42)-induced impairment of synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2012;32:3081-7.
37. Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J*. 2013;27:187-98.
38. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 2003;9:453-7.
39. Grolla AA, Sim JA, Lim D, Rodriguez JJ, Genazzani AA, Verkhratsky A. Amyloid-beta and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. *Cell Death Dis*. 2013;4:e623.
40. Pirttimäki TM, Codadu NK, Awni A, Pratik P, Nagel DA, Hill EJ, et al. $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PLoS One*. 2013;8:e81828.
41. Lee K-I, Lee H-T, Lin H-C, Tsay H-J, Tsai F-C, Shyue S-K, et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2016;13:92.
42. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006338.
43. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*. 2002;22:183-92.
44. Varga E, Juhász G, Bozsó Z, Penke B, Fülöp L, Szegedi V. A β (1-42) enhances neuronal excitability in the CA1 via NR2B subunit-containing NMDA receptors. *Neural Plast*. 2014;2014:584314.
45. Lei M, Xu H, Li Z, Wang Z, O'Malley TT, Zhang D, et al. Soluble A β oligomers impair hippocampal LTP by disrupting glutamatergic/GABAergic balance. *Neurobiol Dis*. 2016;85:111-21.
46. Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2518-27.
47. Kervern M, Angeli A, Nicole O, Leveille F, Parent B, Villette V, et al. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. *J Alzheimers Dis*. 2012;32:183-96.
48. Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int*. 2008;52:142-54.
49. Scimemi A, Meabon JS, Woltjer RL, Sullivan JM, Diamond JS, Cook DG. Amyloid- β 1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci*. 2013;33:5312-8.
50. Yi C, Mei X, Ezan P, Mato S, Matias I, Giaume C, et al. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*. 2016;7:1-11.
51. Grod S, Maurin M, van der Sanden B, Boisseau S, Appaix F, Guillemin I, et al. Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One*. 2012;7:e35169.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit



Effet de l'inhibition chronique du canal TRPA1 chez les souris APP/PS1

Dans une seconde étude (article en cours de rédaction), nous avons évalué l'implication du canal TRPA1 dans la mise en place des processus physiopathologiques en lien avec la maladie d'Alzheimer dans le modèle murin APP/PS1-21.

Nous avons débuté cette étude par un état des lieux de la mise en place des défauts fonctionnels, morphologiques et biochimiques dans le modèle APP/PS1-21. A 1 mois, ces souris présentent une hyperactivité neuronale et astrocytaire hippocampale qui ne s'accompagne pas encore d'anomalies morphologiques ou biochimiques. A 3 mois, les souris transgéniques présentent toujours une hyperactivité astrocytaire, mais par contre, l'activité neuronale est fortement réduite en fréquence et en amplitude par rapport aux animaux contrôles. Ce stade intermédiaire est associé à une diminution de la densité et du niveau de maturation des épines dendritiques, ainsi qu'une diminution de la proportion de synapses tripartites, mise en évidence par microscopie électronique dans le *stratum radiatum*.

Dans un second temps, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique chronique du canal TRPA1 à partir du quinzième jour post-natal chez ces souris (début de la surproduction d'A β) permet de maintenir l'activité neuronale et astrocytaire à un niveau basal chez des animaux de 1 mois et de prévenir la mise en place de l'hypoactivité neuronale et de la perte d'épines dendritiques à 3 mois. A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, il reste à déterminer si l'inhibition chronique de TRPA1 permet de restaurer l'enrobage des synapses par des prolongements astrocytaires et donc la proportion de synapses tripartites par des analyses de microscopie électronique.

Enfin, l'étude de la mémoire spatiale chez les animaux APP/PS1-21, nous a permis de montrer que l'inhibition chronique du canal TRPA1 permet de prévenir les troubles d'apprentissage et de mémoire de travail à 6 mois. Cependant, cela n'empêche pas l'apparition de troubles de la mémoire de référence.

Des expériences sont en cours pour analyser plus en détail l'effet de l'inhibition pharmacologique chronique de TRPA1 sur différents marqueurs de progression de la pathologie dans le modèle APP/PS1 à 6 mois. Nous allons étudier l'effet de ce traitement sur l'expression de différents marqueurs d'inflammation, permettant d'évaluer notamment l'activation

Résultats

microgliale et de tenter d'identifier le sous-type astrocytaire impliqué dans l'astrogliose observée (A1 ou A2). Nous allons également quantifier le nombre et la taille des plaques amyloïdes, ainsi que l'expression et la localisation de l'AQP4 pour déterminer si l'inhibition chronique de TRPA1 pourrait avoir un impact sur la clairance du peptide.

Cette étude permettra d'établir le rôle du canal TRPA1 dans l'apparition de plusieurs marqueurs fonctionnels, structuraux et cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer.

The astrocytic TRPA1 calcium channel blockade prevents preclinical neuronal dysfunctions and learning impairments in a mouse model of Alzheimer's disease

Adrien Paumier¹, Sylvie Boisseau¹, Alain Buisson¹ and Mireille Albrieux^{1,*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, GIN, 38000 Grenoble, France

* Correspondence and requests for materials should be addressed to Dr Mireille Albrieux, GIN, Chemin Fortuné Ferrini, BP170, F-38000 Grenoble. E-mail: mireille.albrieux@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Hippocampal neuronal hyperactivity is one of the earliest events that occur in preclinical stages of Alzheimer's disease (AD). In mouse, we previously showed that amyloid β -dependent TRPA1 channel activation triggers hippocampal astrocyte hyperactivity that subsequently elicits nearby neurons hyperactivity. Using the APP/PS1-21 mouse model of AD, we find here that chronic blockade of TRPA1 with HC030031 normalizes astrocytic activity, prevents neuronal dysfunctions and preserves structural synaptic integrity. These protective effects are sufficient to prevent the occurrence of spatial working memory decline in this AD mouse model. Our study establishes that $A\beta$ toxic impact on astrocyte through TRPA1 channel activation is a critical juncture in AD progression. TRPA1 blockade could prevent irreversible neuronal dysfunction highlighting TRPA1 as a potential neuroprotective therapeutic target.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) starts long before the clinical diagnosis and an unmet challenge for medicine is to define the primary mechanisms leading to the onset of the disease. Indeed, understanding pathological mechanisms at work during the preclinical stages of (AD) is pivotal for the design of successful approaches to delay or even reverse the transition from normal brain physiology to cognitive impairments. More than two decades ago, amyloid- β ($A\beta$) dyshomeostasis was proposed as the major initiating factor of AD, upstream of alterations in other proteins¹. Functional brain changes such as impaired neuronal activity have been associated with $A\beta$ amyloidosis². Several lines of evidence indicate that neuronal hyperactivity is a potential key feature of early stage of AD^{3,4}. In human, functional imaging studies reveal that the AD prodromal phase is characterized by neuronal hyperactivity in the hippocampus which is associated with amnesic mild cognitive impairment (aMCI) in which memory deficits are present but do not significantly impair activities of daily life⁵. In AD mice model, it has been shown that this early hippocampal excessive neuronal activation implicates an essential role for soluble oligomeric $A\beta$ ³ and crucially contributes to cognitive decline and disease progression^{4,6,7}.

In the brain, neuronal activity is tightly regulated by astrocytes that sense the activity of the synapses which they enwrap and modulate neurotransmission by taking up or releasing neuroactive factors⁸. Astrocytes react to virtually all types of pathological alterations and are implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disease such as AD⁹. Indeed, astrocytes also become hyperactive in AD models¹⁰⁻¹². In early AD stage, we showed that this astrocytic hyperactivity is present from the onset of $A\beta$ production, well before any inflammatory process and drives the early neuronal hyperactivity within the CA1 hippocampus¹². We identified an astrocytic calcium channel (TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1) implicated in this early toxicity and showed that specific acute pharmacological blockade of TRPA1 reversed the abnormal activities of both astrocytes and neurons¹².

TRPA1 channel is a nonselective calcium channel initially described in nociceptive peripheral sensory neurons¹³. Within the central nervous system, this channel is expressed on astrocytes in the hippocampus, is poorly involved in basal Ca^{2+} signaling in physiological conditions and seems to behave only as an "aggression sensor" in noxious condition¹⁴⁻¹⁷. A specific TRPA1 inhibitor (HC030031, $IC_{50} \approx 7.6 \mu M$ ¹⁸) can be easily delivered intraperitoneally as

successfully done for neuropathic pain treatment ¹⁸⁻²⁰. This specific inhibitor goes through the blood brain barrier and showed no adverse effect in human preclinical studies ²¹.

Therefore, we aimed to evaluate the protection induced by the chronic pharmacological inhibition of the TRPA1 channel and to characterize the short-, medium- and long-term effects of this protection on AD progression at a functional, morphological, biochemical and behavioral level. We found that chronic treatment with TRPA1 inhibitor normalized neuronal and astrocytic activity, protected structural synaptic integrity from irreversible degeneration and partly avoided mnesic decline.

Methods

Animals

All experiments were performed according to animal care guidelines in agreement with the European Community Council directives of November ²⁴, 1986 (86/609/EEC), in accordance with the French national institutional animal care guidelines (protocol APAFIS#19142-2018121715504298) and with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee". We used a transgenic mouse model that coexpresses the mutated human form of the amyloid precursor protein (mutated APP KM670/671NL) and presenilin 1 (mutated PS1 L166P) under the control of Thy1 neuronal promoter ²². In some experiments, APP/PS1-21 mice were cross-bred with the transgenic Thy1-eYFP-H ²³ mouse that expressed fluorescent protein (eYFP) in specific projection neuron populations. Animals were housed in groups on a 12h light/dark cycle with food and water available ad libitum.

Chronic intraperitoneal drug treatment

The TRPA1 specific inhibitor, HC030031 18 (Tocris Bioscience), was solubilized in 16 % DMSO, 0.6 % Pluronic acid F-127 and sterile saline. HC030031 was daily administered intraperitoneally (5 mg/kg body weight) to male and female transgenic mice and their wild-type aged-matched and sex-matched littermates (WT) from the 15th postnatal day (onset of Thy1 gene promoter expression in the hippocampus ²³ triggering overproduction of A β in the APP/PS1-21 model). This dose has already been used in models of neuropathic pain in rodents with a substantial analgesic effect and without any toxicity ¹⁸⁻²⁰. The HC030031 effects will be compared to APP/PS1-21 and WT groups, daily injected with the vehicle only.

Slice preparation

Coronal hippocampal slices (300 μ m thick) were prepared from APP/PS1-21 transgenic mice (1- and 3-month-old) or aged-matched and sex-matched WT littermates. Mice were killed by decerebration and decapitated. The brain was rapidly removed and cut in ice-cold cutting ACSF containing (in mM): 2.5 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 11 D-glucose and 234 sucrose bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂, with a vibratome VT1200S (Leica, Wetzlar, Germany). Slices containing the hippocampus were placed in ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄ bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂ and supplemented with 1 mM sodium pyruvate at room temperature for a

recovery period. When appropriate, 40 μM HC030031 was bath applied during 5 min before and during calcium imaging or electrophysiological recordings.

Single-astrocyte dye loading with Fluo-4

Coronal 300 μm slices were transferred to a chamber allowing constant perfusion with ACSF at room temperature, bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂ on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 60x objective (NA 1.0) and an infrared-differential interference contrast optics with CCD camera (Optronis VX45, Kehl, Germany). Glass pipettes 8-11 M Ω (Harvard apparatus) were filled with intracellular solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.2 Fluo-4 pentapotassium salt (Life Technologies), adjusted to pH 7.2 with KOH. Signals were amplified by Axopatch 200B, sampled by a Digidata 1440A interface and recorded with pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA). Astrocytes were identified based on morphological, localization in the stratum radiatum and negative resting potential (between -70 and -80 mV). The membrane potential was hold at -80 mV. Input resistance was calculated by measuring current in response to a 10 mV pulse with 80 ms duration, near the end of the voltage command. Only passive astrocytes showing linear I/V relationship and low input resistance (~ 50 M Ω) were kept for dye loading. After achieving whole-cell configuration, access resistance was constantly monitored, and astrocytes were excluded from this study when this parameter varied > 20 % throughout the experiment. To allow sufficient diffusion of the dye and avoid astrocyte dialysis, the time in whole-cell configuration was limited to less than 5 min. Then, the patch pipette was carefully withdrawn to allow the astrocyte to recover. In order to maximize the diffusion of the dye into the astrocytic processes, we waited at least 5 min before calcium imaging^{12,24,25}.

Calcium imaging

Single-astrocyte loaded slices were recorded in a constantly perfused chamber on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 60x (NA 1.0) objective and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France). Excitation was achieved with light at 488 nm and emission was filtered with a 515 ± 15 nm filter. Images were acquired with EZ-C1 software (Nikon, Paris, France) at 1.2 s intervals in a single confocal plane over a period of 5 min.

Ca²⁺ transients were measured in two-dimensional images, in individual subregions matching the shape of the astrocyte structure. Manually selected ROIs (~ 1 μm^2) were placed along

astrocytic processes lying in the focal plane ^{12,24} and a ROI was also selected in the soma if accessible. Prior to analysis, raw images were stabilized (when needed if slight x-y drift occurred during recordings, z drifts were excluded) using ImageJ plugins Template Matching and filtered with 3D Hybrid Median Filter ²⁶. CalSignal software ²⁷ was used to measure intracellular Ca²⁺ activity, analyzing the fluorescence signal F within each ROI. Significant changes in fluorescence were detected on the basis of the calculated $\Delta F/F_0$ ratios. F₀ was calculated for each ROI on the recording period. Based on the $\Delta F/F_0$ ratios, significant fluorescence variations were detected and a Ca²⁺ event was defined as a significant and continuous signal increase larger than a fixed threshold followed by a significant and continuous signal decrease larger than the same threshold. Thus, ROIs were defined as active when fluorescence increased ≥ 2 standard deviations relative to baseline fluorescence. After peak detection, each Ca²⁺ transients were visually checked by the operator.

Electrophysiological recordings

Whole-cell recordings were made from the somata of visually identified CA1 pyramidal neurons. Patch pipettes (4-6 M Ω) were filled with an internal solution containing (in mM): 105 K-gluconate, 30 KCl, 10 phosphocreatine, 10 HEPES, 4 ATP-Mg, 0.3 GTP-Tris, 0.3 EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH. Spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) were collected at a membrane holding potential of -60 mV which is close to the reverse potential of GABA. All recordings were done at room temperature (22-24°C) and only a single neuron was studied per slice. sEPSCs and their kinetics were analyzed, after a stabilization period of 10 min, within 5 min of the recordings. Access resistance was constantly monitored and recordings were excluded from this study when this parameter varied > 20 % throughout the experiment. Recordings were analyzed using the Clampfit module of the pClamp8 software (Molecular Devices, Foster City, USA) with a threshold at 20 pA to exclude miniature EPSCs.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with intraperitoneal injection of 320 mg/kg sodium pentobarbital and perfused intracardially with 25 ml 0.1 M PBS followed by 25 ml 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.3. Brains were rapidly removed, post-fixed overnight at 4°C in 4 % paraformaldehyde, immersed in 20 % sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.5 overnight, frozen in cooled (-35°C) isopentane and stored at -30°C. Serial frontal sections (30 μ m thick) were cut with a cryostat microtome (HM 500 M, Microm, Francheville, France). Sections were blocked by incubation with 3% bovine serum albumin in TBS-Tween-Triton (TBSTT) (0.1 M

Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween, 0.1 % Triton X-100) for 30 minutes (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4°C with either an anti-GFAP antibody (Molecular Probes, USA, mouse monoclonal; 1:1000), anti-TRPA1 antibody (Novus, USA, rabbit polyclonal; 1:100) or anti-Iba-1 antibody (Wako, USA, rabbit polyclonal; 1:500). Tissue sections were washed in TBSTT and incubated for 2 h at room temperature with Cyanin 3- (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA; 1:1000) or Alexa 488-conjugated secondary antibodies (Life Tecchnology, USA; 1:1000). Sections were washed in TBSTT and mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, USA).

When appropriate, amyloid- β deposits were stained using Thioflavine S 28. Sections were re-hydrated in TBS buffer (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl), incubated in filtered 1 % aqueous Thioflavine S (Sigma, France) for 8 minutes at room temperature, in the dark and washed several times in TBS buffer.

Dendritic spine analysis

Hippocampal sections of Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 mice were imaged using a Zeiss Airyscan module with an oil immersion Plan Apochromat 100x objective (NA 1.4) to improve lateral resolution (~140 nm) and signal-to-noise ratios. Confocal image stacks (200 nm step) were realized with a voxel size of $0.041 \times 0.041 \times 0.2 \mu\text{m}$. 3D analysis of spine density, spine volume and spine classification was performed using NeuronStudio software (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA). Length of individual dendrites was automatically measured as well as the number and volume of associated spines which were classified as stubby, thin or mushroom populations using automated 3D shape classification⁶². For each condition, 10 dendrites were imaged and 700 spines were analyzed.

Barnes maze experiments

Mice were placed in the center of a brightly lit open platform (BioSeb, diameter 120 cm). The platform was confined with 20 holes (diameter 5 cm) with an escape box (target) fixed below one hole. The first training day, mice were first placed in the middle of the platform and gently guided to the target after 5 min of free exploration. Once the mice had entered the escape box, they stayed for 1 min before being put back in the home cage. During the 3 days training/acquisition phase, mice performed 3 trials a day with an intertrial interval of 20 min. The mice had 180 s to find the escape box or were gently guided to it. On day 4 (probe trial), the escape box was removed and the mice were allowed to freely explore the maze for 60 s.

Primary time to target and time exploring target area (target hole +/- 1) were analyzed. All data were recorded and analyzed with EthoVision XT9 (Noldus).

Statistical analysis

The sample size for the different sets of data is mentioned in the respective figure legends. Results are expressed as mean \pm SEM from independent biological samples accompanied by distribution of experimental points. Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software. Comparisons between two groups were conducted with the two-tailed Mann-Whitney test. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was used for multiple comparisons. Proportions were compared with Fischer's exact test. We checked the possible sex-dependence of neuronal activity, astrocytic activity and mnesic performance in treated groups and found no significant difference so results were pooled for analysis (Supplementary Tables 1 and 2). Graphic significance levels were *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ and n.s., not significant.

Results

Functional and structural alterations of neurons and astrocytes in the early and intermediate AD stages

We first investigated the progression of neuron and astrocyte activity in the hippocampus of APP/PS1-21 mice. Transgenic mice overexpressing mutant APP in combination with mutant PS1 produce high levels of A β and develop amyloid pathology that is similar to that found in human brain²². Significant A β 42 levels are detected from 1-month-old in this model while the first amyloid plaques appeared in the hippocampus around 3-4 months of age²². These ages can be related to early and intermediate stages in the AD progression. We recorded CA1 pyramidal neurons spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) performing whole-cell patch-clamp recordings on CA1 neurons cell bodies in 1-, 2- and 3-month-old mice. We showed an increase of CA1 neurons sEPSCs frequency in 1-month-old APP/PS1 mice (0.20 ± 0.06 Hz in APP/PS1 mice *versus* 0.08 ± 0.03 Hz in WT; $p = 0.0266$; Fig. 1a). This hyperactivity gradually shifted to hypoactivity in 3-month-old APP/PS1-21 mice (0.03 ± 0.01 Hz in APP/PS1 mice *vs* 0.08 ± 0.02 Hz in WT; $p = 0.0029$; Fig. 1a). At 2-month-old, we observed a transitional situation with both hyperactive and hypoactive neurons (Fig. 1a). The sEPSCs amplitude was unaffected at 1-month-old (33.7 ± 1.9 pA in APP/PS1 mice *vs* 33.0 ± 2.3 pA in WT; $p = 0.9551$; Fig. 1b) and was reduced at 3-month-old (28.9 ± 1.0 pA in APP/PS1 mice *vs* 35.2 ± 1.9 pA in WT; $p = 0.0038$; Fig. 1b) which exacerbated the net CA1 neuronal hypoactivity.

To investigate astrocytic calcium activity, we loaded individual astrocytes with Fluo-4 dye having access to single cell processes microdomains activity^{12,24}. The proportion of active microdomains increased in 1-month-old APP/PS1 mice (67.9 ± 3.3 % in APP/PS1 mice *vs* 56.2 ± 2.9 % in WT; $p = 0.0145$; Fig. 1c) and remained high in 3-month-old mice (66.2 ± 2.5 % in APP/PS1 mice *vs* 53.3 ± 4.1 % in WT; $p = 0.0266$; Fig. 1c). The frequency of calcium events within each active microdomain increased at 1-month-old (0.65 ± 0.10 event/min in APP/PS1 mice *vs* 0.49 ± 0.05 event/min in WT; $p < 0.001$; Fig. 1d) and persisted in being high at 3-month-old (0.68 ± 0.06 event/min in APP/PS1 mice *vs* 0.50 ± 0.05 event/min in WT; $p < 0.001$; Fig. 1d) revealing a stable over time astrocyte calcium hyperactivity. Thus, A β overproduction has an early impact on astrocyte and neuron activity, triggering sustained astrocyte hyperactivity in 1- and 3-month-old mice together with temporary neuronal hyperactivity at 1-month-old that shifted to hypoactivity at 3-month-old.

At a structural level, we analyzed the spine density and morphology of pyramidal CA1 neurons in transgenic Thy1-eYFP-H mice²³ cross-bred with APP/PS1-21 mice (Fig. 1e). At 1-month-old, there was no difference in either the spine density or morphology in APP/PS1 *versus* WT mice (Fig. 1f, g) while at 3-month-old there was a reduction in spine density (1.13 ± 0.05 spine/ μm in APP/PS1 mice *vs* 1.54 ± 0.08 spine/ μm in WT; $p < 0.001$; Fig. 1f). Concomitantly, there was an increase in the proportion of immature thin spine (40 ± 2.5 % in APP/PS1 *vs* 21.9 ± 1.6 % in WT; $p < 0.001$; Fig. 1g) and a reduction in the proportion of mature mushroom spine (45.7 ± 2.5 % in APP/PS1 *vs* 62.4 ± 2.0 % in WT; $p < 0.001$; Fig. 1g). Meanwhile, we analyzed the astrocytic coverage of *stratum radiatum* synapses thanks to electron microscopy (Fig. 1h). In 3-month-old transgenic mice, we highlighted a reduction of tripartite synapse proportion (41.8 ± 2.8 % of tripartite synapse in APP/PS1 *vs* 54.7 ± 3.7 in WT; $p < 0.001$; Fig.1i). Thus, the implementation of the decrease in CA1 neuronal sEPSCs frequency and amplitude was concomitant with a significant reduction in spine density and maturity at 3-month-old in APP/PS1 mice together with a reduction of the astrocytic coverage of synapses.

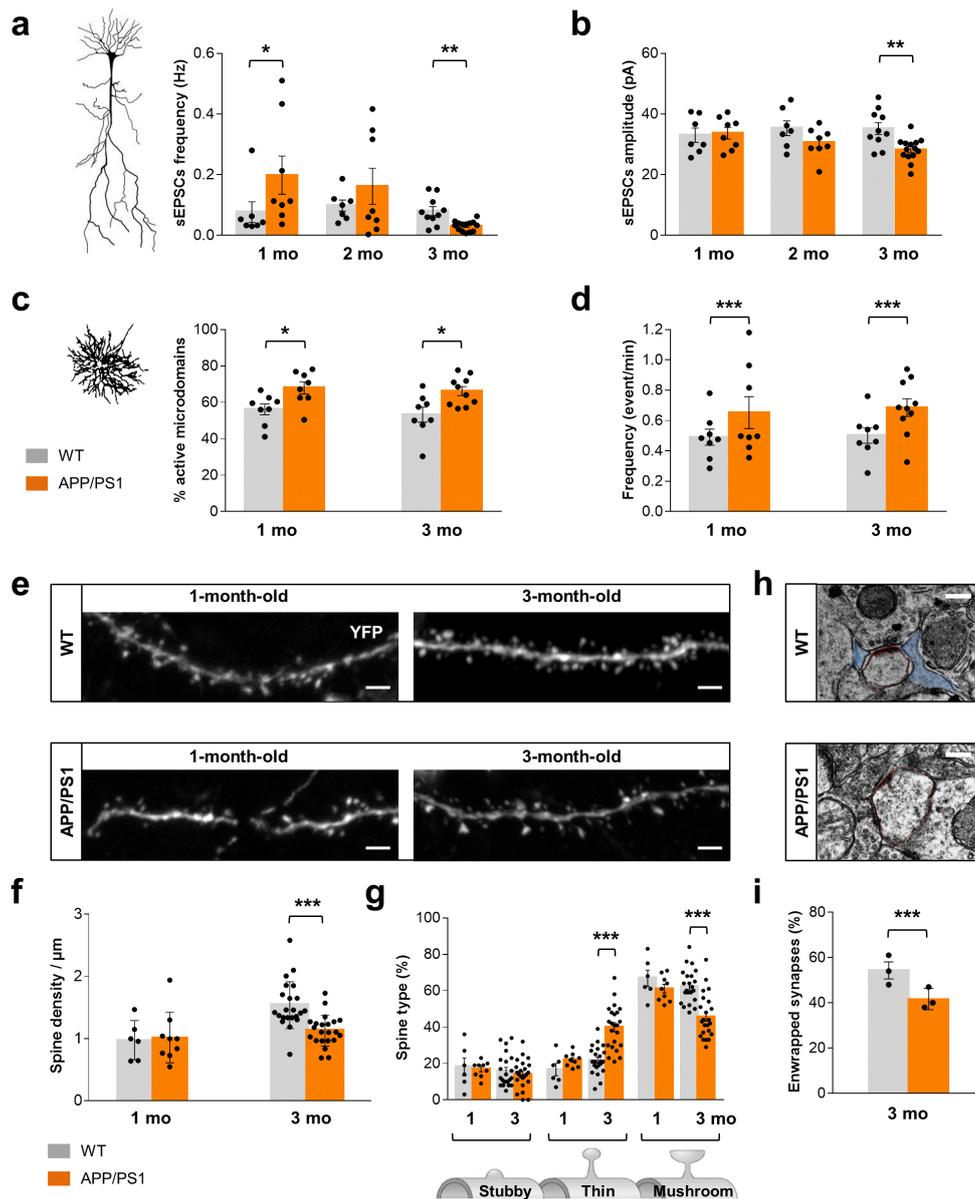


Figure 1 Time course of early functional and structural impairments on neurons and astrocytes in APP/PS1-21 mice. **(a, b)** Histograms showing CA1 pyramidal neurons spontaneous EPSCs frequency and amplitude in APP/PS1-21 mice (orange) and WT littermates (grey) at 1-month-old ($n = 8$ neurons from 6 animals in APP/PS1 and 7 neurons from 5 animals in WT), 2-month-old ($n = 8$ neurons from 5 animals in APP/PS1 and 7 neurons from 4 animals in WT) and 3-month-old ($n = 14$ neurons from 7 animals in APP/PS1 and 10 neurons from 5 animals in WT). **(c)** Within astrocytic arbor, proportion of subregions displaying calcium activity in APP/PS1-21 (orange) and WT littermates (grey) at 1-month-old ($n = 8$ astrocytes from 7 animals in APP/PS1 and 8 astrocytes from 6 animals in WT) and 3-month-old ($n = 10$ astrocytes from 4 animals in APP/PS1 and 8 astrocytes from 3 animals in WT). **(d)** Frequency of calcium events in active microdomains in APP/PS1-21 (orange) and WT littermates (grey) at 1-month-old ($n = 650$ microdomains from 8 astrocytes in APP/PS1 and 454 microdomains from 8 astrocytes in WT) and 3-month-old ($n = 1504$ microdomains from 10 astrocytes in APP/PS1 and 840 microdomains from 8 astrocytes in WT). Each dot corresponds to the mean frequency recorded in each individual astrocyte. **(e)** Representative images of pieces of CA1 pyramidal neuron dendrites expressing eYFP in Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 mice and their WT littermates at 1-month-old (left) and 3-month-old

(right). **(f, g)** Quantification of spine density and morphology in APP/PS1-21 (orange) and their WT littermates (grey) at 1-month-old ($n = 32$ dendrites from 3 animals in APP/PS1 and 28 dendrites from 3 animals in WT) and 3-month-old ($n = 23$ dendrites from 3 animals in APP/PS1 and 22 dendrites from 3 animals in WT). Scale bar = 2 μm . **(h)** Electron micrographs of *stratum radiatum* in a 3-month-old WT and APP/PS1-21 mice showing an example of a synapse enwrapped or not by astrocytic perisynaptic processes (blue). Approximate scale bar: 0.5 μm . **(i)** Quantification of the proportion of enwrapped synapses in 3-month-old WT ($n = 441$ synapses from 3 mice) and APP/PS1-21 mice ($n = 480$ synapses from 3 mice). Each dot corresponds to the mean proportion measured in each individual mouse. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (Mann-Whitney or Fischer's exact test).

Chronic inhibition of TRPA1 fully reversed CA1 astrocyte and neuronal hyperactivity at 1-month-old in APP/PS1 mice

We previously showed that the early astrocyte calcium hyperactivity is dependent on TRPA1 channel activation since its acute blockade with HC030031 fully restored the astrocyte activity to its physiological level in 1-month-old APP/PS1-21 mice¹². Strikingly, blocking TRPA1 also totally reversed the early neuronal hyperactivity in this transgenic AD mice model¹² suggesting that astrocytes are largely involved in the setting up of hippocampal neuronal hyperactivity (Supplementary Fig. 1a, b). We thus wonder if blocking this A β -dependent TRPA1 activation as soon as A β is overproduced in the brain could protect neurons and restore neuronal function. We thus daily administered the specific inhibitor of TRPA1 channel (HC030031) intraperitoneally (5 mg/kg body weight) from the 14th postnatal day until 1-month of age in APP/PS1-21 mice. As a control, we injected the same volume of vehicle in age-matched and sex-matched control groups and we ensured that it had no effect on the parameters studied in either transgenic and WT littermates mice (summarized in Supplementary Table 3). We observed that the HC030031 pharmacological treatment prevented the occurrence of hippocampal astrocytic calcium hyperactivity in APP/PS1-21 mice affecting both the proportion of active microdomains (56.1 ± 3.9 % in HC030031-treated mice vs 71.8 ± 2.5 % in vehicle-treated mice; $p = 0.0439$; Fig. 2c) and the calcium event frequency (0.48 ± 0.02 calcium event/min in HC030031-treated mice vs 0.79 ± 0.04 calcium event/min in vehicle-treated mice; $p < 0.001$; Fig. 2d). These parameters were both restored to physiological values (56.9 ± 3.6 % of active microdomains and 0.56 ± 0.03 calcium event/min in vehicle-treated WT mice; $p = 0.7211$ and 0.1456 respectively). Conversely, HC030031 had no effect on the proportion of active microdomains in the WT littermates (53.0 ± 2.7 % in HC030031-treated vs 56.9 ± 3.6 % in vehicle-treated mice; $p = 0.8627$; Fig. 2c) and slightly decreased the frequency of calcium events within microdomains (0.51 ± 0.02 calcium event/min in HC030031-treated vs 0.56 ± 0.03 in vehicle-treated mice; $p = 0.031$; Fig. 2d) confirming that TRPA1 is poorly implemented in physiological condition^{12,15}.

Concomitantly, HC030031 treatment prevented the occurrence of hippocampal neuronal hyperactivity in transgenic mice (0.10 ± 0.02 Hz in HC030031 vs 0.24 ± 0.04 Hz in vehicle; $p = 0.0311$; Fig. 2a) restoring the sEPSCs frequency to physiological value (0.10 ± 0.02 Hz in vehicle-treated WT mice; $p = 0.7213$) at 1-month-old. Meanwhile, HC030031 treatment had no effect on the WT littermates (0.10 ± 0.04 Hz in HC030031 vs 0.10 ± 0.02 Hz in vehicle; $p >$

0.999; Fig. 2a). sEPSCs amplitude was not affected in 1-month-old transgenic mice (Fig. 1b) and HC030031 treatment did not impact this parameter ($p > 0.999$; Fig. 2b).

These data suggested that the TRPA1 blockade from the onset of A β production in transgenic AD mice model was enough to prevent hippocampal neuronal hyperactivity at 1-month-old confirming that astrocytes played a major role in this early A β -dependent toxicity.

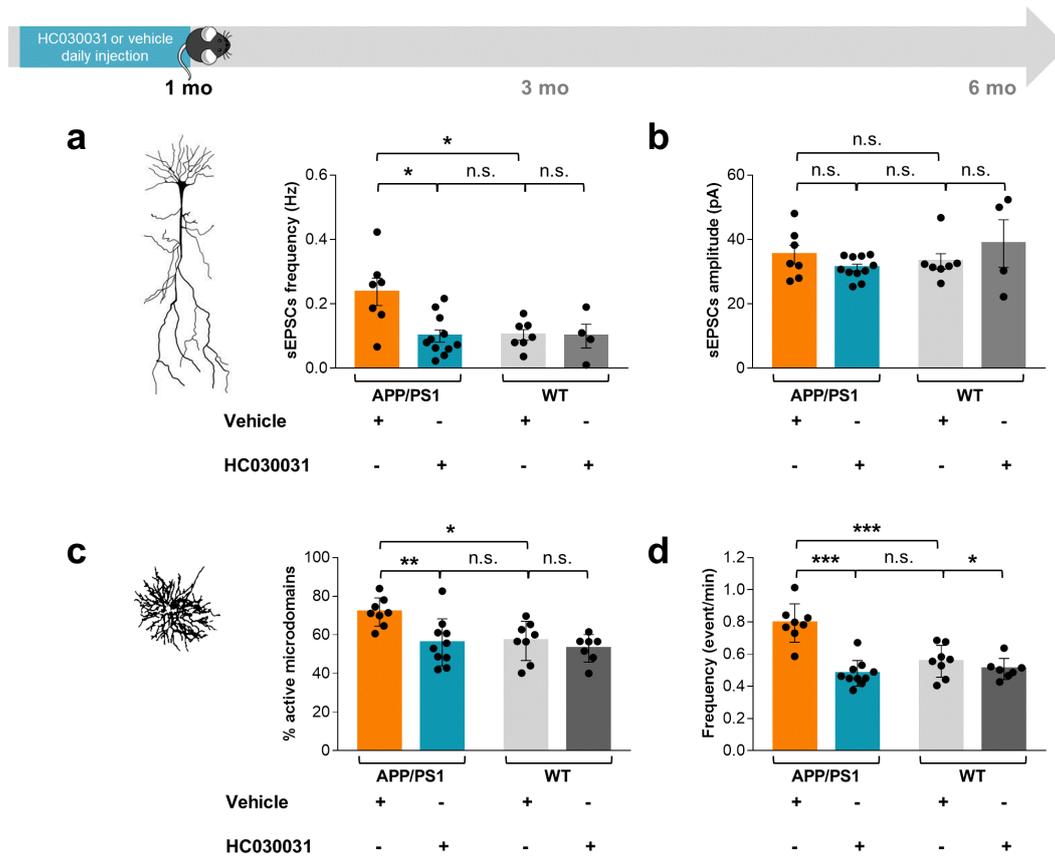


Figure 2 Chronic HC030031 treatment restores neuron and astrocyte hyperactivities in 1-month-old APP/PS1-21 mice. (a, b) Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 14 days on sEPSCs frequency and amplitude in APP/PS1-21 mice (n = 11 neurons from 5 HC030031-treated mice and 7 neurons from 5 vehicle-treated mice) and WT littermates (n = 4 neurons from 2 HC030031-treated mice and 7 neurons from 4 vehicle-treated mice). (c) Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 14 days on the proportion of astrocytic subregions displaying calcium activity in APP/PS1-21 (n = 10 astrocytes from 3 HC030031-treated mice and 8 astrocytes from 3 vehicle-treated mice) and WT littermates (n = 7 astrocytes from 2 HC030031-treated mice and 8 astrocytes from 3 vehicle-treated mice). (d) Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 14 days on the frequency of calcium activity within astrocytic subregions in APP/PS1-21 (n = 771 microdomains from 10 astrocytes in HC030031 condition and 1303 microdomains from 8 astrocytes in vehicle condition) and WT littermates (n = 816 microdomains from 7 astrocytes in HC030031 and 995 microdomains from 8 astrocytes in vehicle). *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; n.s., not significant (Kruskal-Wallis tests).

Chronic inhibition of TRPA1 fully reversed CA1 neuronal hypoactivity and dendritic spine impairment at 3-month-old in APP/PS1-21 mice

Neuronal hyperactivity is foreseen as a key feature of early stage of AD⁴⁻⁶ triggering a vicious cycle leading to dysregulation of the whole network. In our model, this further dysregulation manifested through neuronal hypoactivity and dendritic spine failure at 3-month-old (Fig. 1). We thus wonder if blocking the A β -induced TRPA1 activation could protect neurons from this vicious cycle. We daily administered the specific inhibitor of TRPA1 channel (HC030031) or vehicle intraperitoneally (5 mg/kg body weight) from the 14th postnatal day until 3-months of age in APP/PS1-21 mice. These experiments revealed that chronic TRPA1 inhibition in APP/PS1-21 mice prevented the occurrence of neuronal hypoactivity in either the sEPSCs frequency (0.10 ± 0.01 Hz in HC030031 vs 0.04 ± 0.01 in vehicle; $p = 0.01$; Fig. 3a) or amplitude (33.4 ± 1.4 pA in HC030031 vs 28.5 ± 1.2 in vehicle; $p = 0.0358$; Fig. 3b). Levels of neuronal activity in HC030031-treated APP/PS1-21 mice were thus similar to WT littermates (0.11 ± 0.01 Hz and 32.2 ± 1.1 pA in vehicle-treated WT mice; $p = 0.386$ and 0.6362 respectively). This chronic treatment had no effect on sEPSCs frequency or amplitude in WT mice ($p > 0.999$ for both; Fig.3a, b).

To assess the impact of chronic treatment on spine density and morphology, we administered HC030031 or vehicle from the 14th postnatal day until 3-months of age in Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 transgenic mice. Chronic TRPA1 inhibition resulted in the normalization of spine density (1.32 ± 0.08 spine/ μ m in HC030031-treated mice vs 1.01 ± 0.04 spine/ μ m in vehicle-treated mice; $p = 0.0019$; Fig. 3c) and maturation (26.7 ± 2.0 % of thin spine in HC030031-treated mice vs 32.0 ± 1.6 % in vehicle-treated mice and 64.0 ± 1.7 % of mushroom shape in HC030031-treated mice vs 57.3 ± 1.5 % in vehicle-treated mice; $p = 0.05$ and 0.0117 respectively; Fig. 3d).

Concomitantly, chronic HC030031 treatment in APP/PS1-21 mice persisted in decreasing astrocyte calcium hyperactivity at 3-month-old since both the proportion of active microdomains (49.4 ± 6.4 % in HC030031-treated mice vs 66.2 ± 2.5 % in untreated mice; $p = 0.033$; Fig. 3e) and the frequency of calcium events within these microdomains (0.50 ± 0.06 event/min in HC030031-treated vs 0.68 ± 0.06 event/min in untreated mice; $p < 0.0001$; Fig. 3f) were reduced close to physiological level. Chronic HC030031 treatment had no effect on the proportion of active microdomains in the WT littermates (60.2 ± 3.8 % in HC030031-treated vs 53.2 ± 4.1 % in untreated mice; $p = 0.2786$; Fig. 3e) and slightly increased the frequency of

calcium events within these microdomains (0.62 ± 0.04 calcium event/min in HC030031-treated vs 0.50 ± 0.05 in untreated mice; $p = 0.001$; Fig. 3f).

In order to assess if TRPA1 channel was still directly engaged in ensuing astrocytic and neuronal defects observed in 3-month-old APP/PS1-21 mice, we directly applied HC030031 in acute brain slices of untreated mice. Contrary to what was observed in 1-month-old mice 12, TRPA1 blockade had no impact either on the astrocytic hyperactivity or the neuronal hypoactivity (Supplementary Fig. 1c, d) meaning that TRPA1 is no longer responsible for these settled 3-month-old cellular features. This suggested that compensatory feedbacks are implemented in the hippocampal network and that progressive failures in neuronal homeostasis became independent of the initial triggering factor.

Overall, these data showed that an early chronic inhibition of TRPA1 channels circumvented the setting up of neuronal hyperactivity which appears to be the driving force of early progressive failures triggering the loss of functional dendritic spine and neuronal hypoactivity.

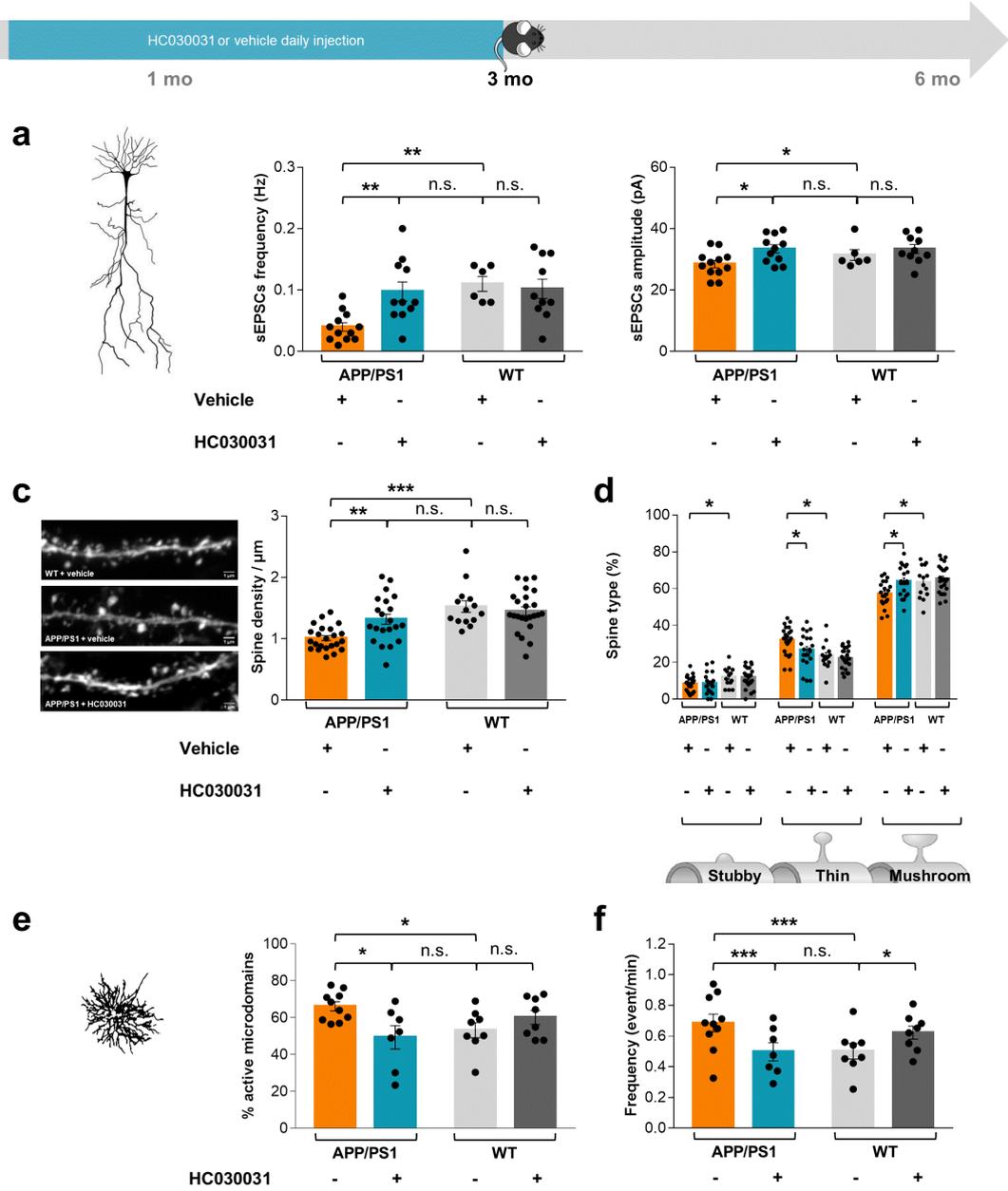


Figure 3 Chronic HC030031 treatment prevents CA1 neuron functional and morphological impairments in 3-month-old APP/PS1-21 mice. **(a, b)** Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 75 days on sEPSCs frequency and amplitude in APP/PS1-21 mice ($n = 11$ neurons from 7 HC030031-treated mice and 12 neurons from 8 vehicle-treated mice) and WT littermates ($n = 11$ neurons from 6 mice in HC030031 and 10 neurons from 9 mice in vehicle). **(c)** Representative images of pieces of CA1 pyramidal neuron dendrites expressing eYFP in Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 mice and their WT littermates treated with vehicle or HC030031 (left). Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 75 days on CA1 neurons spine density (right) in Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 mice ($n = 21$ dendrites from 3 HC030031-treated mice and 23 dendrites from 2 vehicle-treated mice) and WT littermates ($n = 24$ dendrites from 3 HC030031-treated mice and 14 dendrites from 2 vehicle-treated mice). **(d)** Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 or vehicle during 75 days on CA1 neurons spine typology in Thy1-eYFP-H-APP/PS1-21 mice classifying spines in thin, stubby or mushroom. **(e)** Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 during 75 days on the proportion of astrocytic subregions displaying calcium activity in APP/PS1-21 ($n = 7$ astrocytes from 3 HC030031-

Résultats

treated mice and 10 astrocytes from 3 untreated mice) and WT littermates ($n = 8$ astrocytes from 4 HC030031-treated mice and 8 astrocytes from 3 untreated mice). **(d)** Impact of intra-peritoneal injection of HC030031 during 75 days on the frequency of calcium activity within astrocytic subregions in APP/PS1-21 ($n = 1052$ microdomains from 7 astrocytes in HC030031-treated condition and 1504 microdomains from 10 astrocytes in untreated condition) and WT littermates ($n = 1267$ microdomains from 8 astrocytes in HC030031-treated condition and 840 microdomains from 8 astrocytes in untreated condition). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n.s., not significant (Kruskal-Wallis tests).

Chronic inhibition of TRPA1 prevented working memory defects at 6-month-old in APP/PS1-21 mice

Working memory is perhaps one of the most well modeled aspects of the memory deficit in AD³¹. We wonder if preventing the implementation of A β toxicity through TRPA1 blockade could prevent the occurrence of such AD memory defects. We daily administered the specific inhibitor of TRPA1 channel (HC030031) or vehicle intraperitoneally (5 mg/kg body weight) from the 14th postnatal day until 6-months of age in APP/PS1-21 and WT mice. As previously, we ensured that vehicle had no effect on the parameters studied in either transgenic and WT littermates mice (Supplementary Table 3). We performed hippocampus-dependent spatial working and reference memory task using the Barnes maze test paradigm in 6-month-old mice³². During the 3 days acquisition period (8 trials), the temporal latency to reach the escape box decreased over time in both transgenic and WT mice, indicating that they both learned to use the spatial cues to find the escape box (Fig. 4a). However, APP/PS1-21 mice showed an increase in the overall amount of time they took to reach the escape box during this learning phase suggesting a spatial working memory defect in these transgenic mice (materialized by the area under the curve for the latency: 731.8 ± 91.1 in vehicle-treated APP/PS1-21 mice versus 554.1 ± 78.9 in vehicle-treated WT mice; $p = 0.0012$; Fig. 4b). Motor function, measured by the velocity of mice across all days, was similar in all groups ($p = 0.1718$; Fig. 4c). To evaluate reference memory, 24 h after the last acquisition day, mice were subjected to a probe trial in which the escape box was removed. As expected, the latency to find the target area for the first time was increased in APP/PS1-21 mice (13.74 ± 2.1 s in vehicle-treated APP/PS1-21 mice versus 4.8 ± 2.7 s in vehicle-treated WT mice; $p = 0.0057$; Fig. 4d). Therefore, both working and reference spatial memories were impaired in 6-month-old APP/PS1-21 mice compared to their WT littermates. Treatment with HC030031 from the beginning of A β overproduction partly restored these mnemonic defects. Indeed, working memory defects highlighted during the learning phase in transgenic mice were fully restored (AUC: 595.9 ± 77.2 in HC030031-treated APP/PS1-21 mice versus 731.8 ± 91.1 in vehicle-treated APP/PS1-21 mice; $p = 0.0089$; Fig. 4a and b) and became similar to WT (554.1 ± 78.9 ; $p = 0.8054$). Conversely, long-term HC030031 treatment did not improve reference memory since the first latency to target area during the probe test was similarly increased in transgenic mice (18.5 ± 4.2 s in HC030031-treated APP/PS1-21 mice versus 13.74 ± 2.1 s in vehicle-treated APP/PS1-21 mice; $p = 0.6109$; Fig. 4d). Reassuringly, this chronic HC030031 treatment had no impact on working and reference memory performances in WT mice (Fig. 4a-d).

Discussion

Aberrant hippocampal astrocyte and neuron hyperactivity appears to be an early and causal factor in synaptic remodeling leading to AD cognitive decline. This hippocampal network disequilibrium is evident in animal model of AD⁴ but also in presymptomatic AD patients where it heralds and contributes to the further decline^{5,33,34}. We previously showed that A β -dependent astrocyte activation through TRPA1 channel accounts for nearby neuronal hyperactivity in the early AD mouse hippocampus¹². In this study, we investigated the contribution of astrocytes in early neuronal remodeling by blocking TRPA1 channel activation from the beginning of A β overproduction in APP/PS1-21 mice. We found that early treatment with TRPA1 inhibitor (HC030031) normalizes astrocyte activity and protects structural and functional neurons integrity. This early neuroprotection appears to prevent subsequent working memory decline.

Recently, the loss of cellular homeostasis has been hypothesized to initiate the clinical AD phase whereas A β and phosphorylated Tau accumulations have been considered as downstream risk factor³⁵. Our data validated that a failure in the astrocyte-neuron homeostatic machinery underlies firing instability of neuronal circuits and constitutes the common drivers of AD pathogenesis³⁶. In an AD transgenic mice model, we showed that such a critical time window occurs at the onset of A β overproduction expressing through hippocampal astrocytic and neuronal hyperactivity that triggers temporal sequence of undefined dyshomeostatic events leading to synaptic impairments and neuronal hypoactivity. Indeed, for many researchers, new therapeutic strategies will have to control this early dysregulation in order to prevent the collateral damage of neuronal hyperactivity and to protect neural networks^{4,5,36,37}.

Despite their probable involvement in these complex and critical cellular phase of AD³⁵, astrocytes behavior and reactions in early phases of AD remained largely undefined. Astrocytes deploy many fine processes to contact up to 140 000 synapses in the CA1 region and to modulate them³⁸ having an active and pivotal role in information processing in the brain. Therefore, dysfunction of astrocyte key properties (e.g. neurotransmitter re-uptake and recycling, clearance of toxic substances, gliotransmission, homeostasis, metabolic support) could amplify or even induce deleterious toxicity to neurons and contribute to AD pathogenesis^{39,40}. Most of these roles are driven by their highly compartmentalized calcium excitability especially located in specific microdomains close to synapses^{24,41,42}. It has been recently highlighted that astrocytes morphology provides the structural basis for compartmentalized

intracellular signaling occurring in specific nodes in contact with dendritic spines⁴³. Any disturbance in this calcium excitability will have nearby functional repercussions. Indeed, we observed that compartmentalized astrocyte calcium signaling dysfunction was detectable at the beginning of A β overproduction in a transgenic mouse model of AD, i.e. at 1-month of age, and drives the early hyperactivity of nearby CA1 neurons¹². The TRPA1 channel seems to be at the forefront in this A β -induced astrocyte hyperactivity and its neuronal aftermath¹². In the present study, we found that prophylactic treatment with a TRPA1 inhibitor normalizes astrocyte activity to levels normally detected in WT animals. Importantly, this normalization prevents the implementation of hippocampal neuronal hyperactivity confirming a pivotal role for astrocyte preserving synapse integrity. It also ascertains that the early neuronal hyperactivity is the starting point for subsequent synaptic dysfunction, structural collapse and cognitive defects (Fig. 5). Its blockade seems thus to be sufficient to prevent all the vicious circle of AD neurodegeneration.

In that context, further studies will be necessary to dissect molecular mechanisms linking TRPA1-dependent astrocytic calcium hyperactivity and the early deleterious neuronal hyperactivity. We previously showed that TRPA1 channel is located in astrocytes thin processes in a punctiform way congruent with the A β -induced Ca²⁺ hyperactivity in individual astrocytic microdomains¹². This TRPA1 expression might correspond to the recently highlighted functional nodes involved in synapse-specific communication between neurons and astrocytes⁴³. This raises interesting questions about the functional involvement of TRPA1 activation in a Ca²⁺-dependent release of neuroactive substances such as glutamate, D-serine and ATP that could influence synaptic and extrasynaptic transmission^{24,42}. It has already been shown that A β can increase astrocytic release of glutamate to the extrasynaptic space resulting in the activation of extrasynaptic NMDARs and the disruption of neuronal signaling⁴⁴⁻⁴⁶. Moreover, hippocampal astrocytic TRPA1 is known to be required for constitutive D-serine release contributing to NMDA receptor-dependent neuronal function¹⁵. Other neurotransmitters or neuromodulators such as ATP, adenosine or GABA could also be involved in these early pathological mechanisms^{40,47}.

Another issue to be explored is how oligomeric A β can activate TRPA1 channel. The TRPA1 channel is an anionic channel with high unitary conductance (~110 pS) and substantial Ca²⁺ permeability¹³. It is of special interest for being a sensor of a wide variety of noxious external stimuli associated to cell damage⁴⁸. It was found to be expressed in somata and processes of astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus using immunogold electron

microscopy⁴⁹. Functional TRPA1 were also detected in rodent hippocampal astrocytes^{14,15}. Our data assume that hippocampal astrocytic TRPA1 are quickly and largely involved in case of toxic A β presence¹². This rapid activation may be due to a change in the membrane environment that is known to modulate the responses of TRPA1 to chemical and mechanical stimuli. Thus, nonelectrophilic compounds such as A β may act by inducing mechanical alterations in the plasma membrane⁴⁸ especially since TRPA1 localizes preferably in cholesterol-rich domain⁵⁰. These mechanisms will have to be addressed by future studies in order to better understand the net effect of A β early pathogenesis and thus prevent its cellular toxicity.

These initial critical junctures observed at 1-month-old in mouse will likely lead to progressive and irreversible cellular effects involving complex compensatory feedback and feedforward responses over time³⁵. Indeed, the early neuronal hyperactivity observed in 1-month-old transgenic mice will gradually give way to hypoactivity in 3-month-old APP/PS1-21 mice. High-resolution and electron microscopy ultrastructural studies showed that morphological changes such as dendritic spine density decrease and dendritic spine shrinking occurred in 3-month-old APP/PS1-21 mice while they were not noticeable in the early hyperactive stage. These alterations were concomitant with an important and significant reduction of the proportion of tripartite synapses in the stratum radiatum of 3-month-old transgenic animals. Together with dendritic spine density decrease, these morphological alterations of synapse enwrapping could emphasize CA1 neuronal dysfunction and glutamate dyshomeostasis⁵¹. Interestingly, we found that the settled neuronal hypoactivity and astrocyte hyperactivity were no longer dependent on TRPA1 channel activation in 3-month-old transgenic mice. This astrocytic functional remodeling goes along with a morphological remodeling and the establishment of an inflammatory phenotype. The astrocyte role in advanced AD is well known since astrocytic inflammatory phenotype and astrogliosis have long been associated with plaque formation⁵² potentially containing the toxic effect of A β species in plaque compaction³². In aged transgenic AD mouse model, it has been shown that astrocytic calcium activity dramatically increases and becomes synchronous nearby cortical A β plaques^{10,11}. Interestingly, this astrocyte hyperactivity involved the astrocytic P2YR in both cortical and hippocampal area^{10,11} suggesting that astrocyte calcium signaling reorganized in late pathogenic stages, involving a purinergic pathway. Indeed, inflammatory reactive astrocytes comes with structural changes that probably accommodate the molecular signaling machinery, thus affect the way signaling molecules can spread with astrocyte microdomains and dynamically regulate intracellular

signaling⁴³. Concurrently to these remodeling, it might be that TRPA1 involvement turns off towards the regulation of A β -mediated inflammatory response in astrocyte since its genetic ablation mitigated astrocyte-derived inflammatory processes in late AD. Interestingly, such a genetic ablation restores spatial learning and memory deficit in APP/PS1 mice at 8-month-old⁵³ corroborating that TRPA1 might be a key regulator in AD pathogenesis. This suggests that TRPA1 could be alternatively involved in different deleterious effects depending on the disease progression and the evolution of the astrocytic pathophysiological state. Its blockade could therefore prevent the progression of the disease via several pathways, one neuroprotective and one anti-inflammatory.

Our data gave insight into the multidimensional A β effect involved in preclinical neuronal hyperactivity leading to synapse dysfunction and disease onset. In that context, we showed that TRPA1 pharmacological blockade partly restored spatial memory deficit, targeting working memory. Reducing hyperactivity in amnesic mild cognitive impairment (aMCI) patients with low dose of levetiracetam, has already shown its effectiveness in improving cognition and reducing progression to the dementia phase of AD humans⁵⁴. In rodents, low dose of diazepam has also shown beneficial effect in early pre-dementia stages of AD⁵⁵. Part of these effects could come from an inhibition of glutamate release from astrocytes⁵⁶. Astrocytes were also highlighted as an interesting target in normalizing network dysfunction and cognition in a mouse AD model through the involvement of P2YR^{11,32}. Indeed, within late stages, it has been shown that P2YR blockade normalizes astrocytic and neuronal activity and spatial memory in APP/PS1-21 mice³². Other strategies blocking the astrocytic adenosine A_{2A} receptor from an asymptomatic stage, prevent spatial memory impairment and brain amyloid level in AD mouse model⁵⁷. Compared to these encouraging strategies, one advantage of targeting TRPA1 is that this channel appears to be poorly involved in physiological conditions. It seems to behave only as an "aggression sensor" in noxious condition¹⁵⁻¹⁷ thus showed no adverse effect in human preclinical studies^{58,59}. Indeed, our data showed that in healthy WT mice, chronic TRPA1 blockade had no effect on astrocyte activity, neuronal function, synapse structure and mnemonic performance. This strengthens the pertinence of pointing out TRPA1 as an attractive therapeutic target. Indeed, various TRPA1 antagonists have been successfully tested in human phase 1 studies⁵⁸. However, their developments have been discontinued due to their low solubility or complex pharmacokinetics. A promising phase 2 study has also been performed in patients suffering from peripheral diabetic neuropathy delayed the loss of nociceptive nerve endings and

their function⁵⁸. However, novel TRPA1 antagonists with optimal properties for clinical use have to be developed in order to launch more clinical studies.

The recurrent failure of AD therapeutic strategies is partly due to the fact that they target late stages of the disease²¹. Diagnosis methods are currently booming to identify early AD biomarkers⁶⁰. It is therefore urgent to identify therapeutic targets involved in the prodromal phase (e.g. aMCI) in order to prevent neurodegenerative mechanisms. The finding that preclinical hippocampal hyperactivity is an early neuronal dysfunction involved in disease progression represents a major conceptual shift in our understanding of AD especially because it seems to be reversible⁵⁴. TRPA1 channel could thus be a new target that could allow the development of such a neuroprotective treatment.

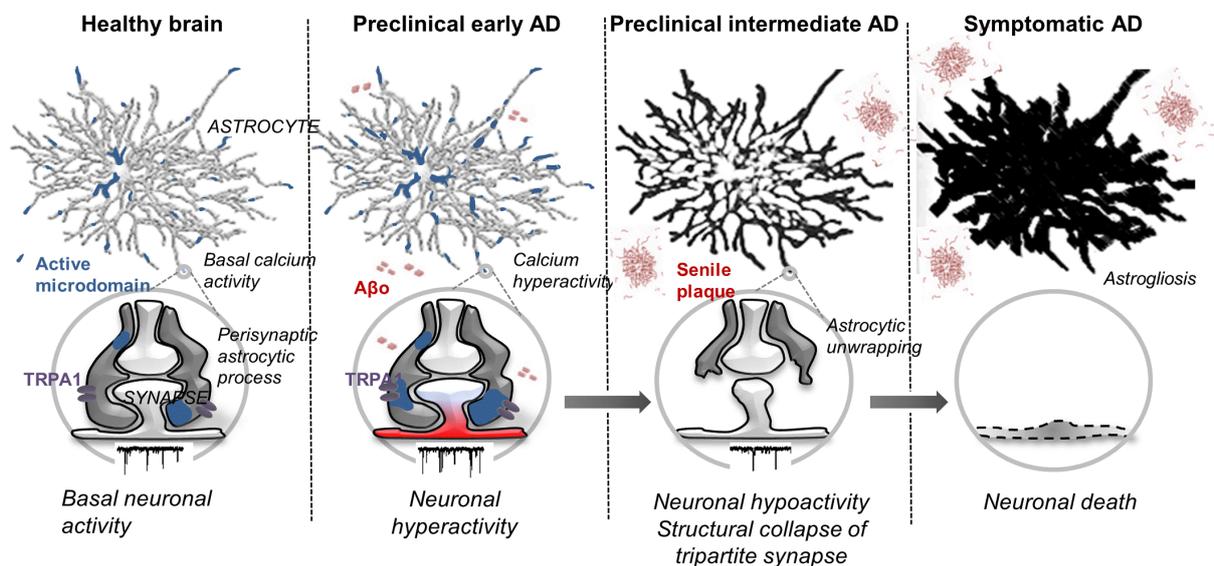


Figure 5 Involvement of astrocytes in synaptic activity regulation in the early stages of AD and progression towards irreversible critical junctures. In physiological conditions, astrocytes exhibit spontaneous calcium activities that contribute to maintain the structural and functional integrity of the synapse (active microdomains in blue). In the early stages of Alzheimer's disease, the presence of the oligomeric amyloid- β peptide ($A\beta_o$) disrupts the functioning of the astrocyte. Via an activating effect of the calcium channel TRPA1, the astrocyte becomes hyperactive which has the consequence of inducing hyperactivity of neighboring neurons. These combined phenomena ultimately lead to synaptic toxicity (neuronal hypoactivity, morphological collapse of dendritic spines, astrocytic unwrapping, dysfunction of the tripartite synapse, etc.), a prelude to memory disorders and neuronal death (symptomatic AD).

Abbreviations

A β : amyloid- β peptide; A β _o: Amyloid- β oligomers; AD: Alzheimer's disease; aMCI: amnesic mild cognitive impairment; Ca: calcium; CA1: Cornu Ammonis 1; GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein; P2YR: P2Y purinoreceptor; PS1: Presenilin 1; ROI: Regions Of Interest; sEPSC: spontaneous Excitatory PostSynaptic Current; TRPA1: Transient Receptor Potential A1 channel; TTX: tetrodotoxin

Declarations

Ethics approval

All experiments were carried out in accordance with the European Community Council directives of November 24, 1986 (86/609/EEC) and with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences Ethical Committee".

Availability of data and material

All data generated or analyzed during this article are included in this published article and its additional information files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Funding

This work was supported by INSERM, University Grenoble Alpes, France Alzheimer and the French National Research Agency in the framework of the "Investissements d'avenir" program (ANR-15-IDEX-02).

AP, SB, AB and MA laboratory is member of the Grenoble Center of Excellence in Neurodegeneration (GREEN).

Authors' contributions

A.P. performed the calcium imaging experiments, the electrophysiological experiments, animal daily treatment and behavioral experiments. S.B. performed the immunoblotting and immunohistochemistry experiments. A.P., A.B. and M.A. designed the experiments. A.P., S.B. and M.A. analyzed the data. A.P. and M.A. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Yasmina Saoudi for her technical assistance in Airyscan image acquisition on PIC-GIN platform of Grenoble Institut des Neurosciences. We thank M. Bartolomucci and the GIN behavioral facility that is supported by the Grenoble Center of Excellence in Neurodegeneration (GREEN).

References

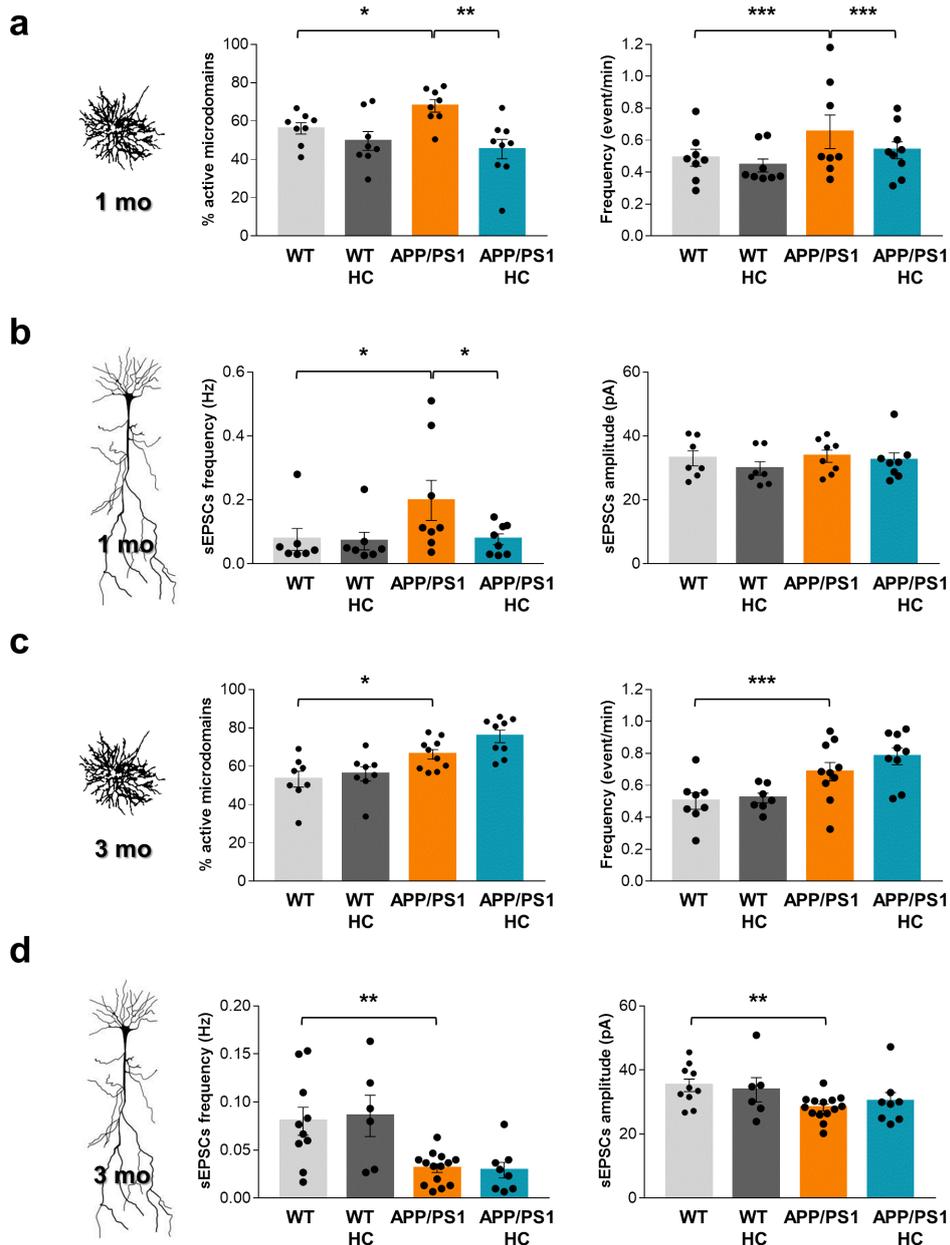
1. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356 (2002).
2. Palop, J. J. & Mucke, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13, 812–8 (2010).
3. Busche, M. A. et al. Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8740–8745 (2012).
4. Zott, B. et al. A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science* 365, 559–565 (2019).
5. Haberman, R. P., Branch, A. & Gallagher, M. Targeting Neural Hyperactivity as a Treatment to Stem Progression of Late-Onset Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 14, 662–676 (2017).
6. Busche, M. A. & Konnerth, A. Neuronal hyperactivity - A key defect in Alzheimer's disease? *BioEssays* 37, 624–632 (2015).
7. Styr, B. & Slutsky, I. Imbalance between firing homeostasis and synaptic plasticity drives early-phase Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 21, 463–473 (2018).
8. Haydon, P. G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2, 185–193 (2001).
9. Shigetomi, E., Saito, K., Sano, F. & Koizumi, S. C. Aberrant calcium signals in reactive astrocytes: A key process in neurological disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 20, (2019).

10. Kuchibhotla, K. V, Lattarulo, C. R., Hyman, B. T. & Bacskai, B. J. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science* . 323, 1211–1215 (2009).
11. Delekate, A. et al. Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat. Commun.* 5, 5422 (2014).
12. Bosson, A. et al. TRPA1 channels promote astrocytic Ca²⁺hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid- β peptide. *Mol. Neurodegener.* 12, 53 (2017).
13. Nilius, B., Appendino, G. & Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 464, 425–58 (2012).
14. Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P. & Khakh, B. S. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat. Neurosci.* 15, 70–80 (2012).
15. Shigetomi, E., Jackson-Weaver, O., Huckstepp, R. T., O'Dell, T. J. & Khakh, B. S. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release. *J. Neurosci.* 33, 10143–53 (2013).
16. Rungta, R. L. et al. Ca(2+) transients in astrocyte fine processes occur via Ca(2+) influx in the adult mouse hippocampus. *Glia* (2016).
17. Nakayama, R., Sasaki, T., Tanaka, K. F. & Ikegaya, Y. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes. *Eur J Neurosci* 43, 923–932 (2016).
18. McNamara, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13525–30 (2007).
19. Eid, S. R. et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain* 4, 48 (2008).
20. Trevisan, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. *Brain* 139, 1361–1377 (2016).
21. Cummings, J. L., Morstorf, T. & Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers. Res. Ther.* 6, 37 (2014).
22. Radde, R. et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–6 (2006).
23. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* 1345, 59–72 (2010).
24. Di Castro, M. A. et al. Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat. Neurosci.* 14, 1276–84 (2011).

25. Nett, W. J., Oloff, S. H. & McCarthy, K. D. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J. Neurophysiol.* 87, 528–37 (2002).
26. Haustein, M. D. et al. Conditions and constraints for astrocyte calcium signaling in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 82, 413–29 (2014).
27. Platel, J.-C. et al. Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 25, 920–928 (2007).
28. Apelt, J. & Schliebs, R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res.* 894, 21–30 (2001).
29. Kamphuis, W. et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One* 7, (2012).
30. Kamphuis, W. et al. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* 35, 492–510 (2014).
31. Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A. & Van Eldik, L. J. Using mice to model Alzheimer’s dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet.* 5, (2014).
32. Reichenbach, N. et al. P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer’s disease model. *J. Exp. Med.* 215, 1649–1663 (2018).
33. Yassa, M. A. et al. High-resolution structural and functional MRI of hippocampal CA3 and dentate gyrus in patients with amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuroimage* 51, 1242–1252 (2010).
34. Miller, S. L. et al. Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 630–635 (2008).
35. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. *Cell* 164, 603–615 (2016).
36. Frere, S. & Slutsky, I. Alzheimer’s Disease: From Firing Instability to Homeostasis Network Collapse. *Neuron* 97, 32–58 (2018).
37. Selkoe, D. J. Early network dysfunction in Alzheimer’s disease. *Science* 365, 540–541 (2019).
38. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–92 (2002).
39. Bouvier, D. S. & Murai, K. K. Synergistic actions of microglia and astrocytes in the progression of Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers. Dis.* 45, 1001–14 (2015).
40. Verkhratsky, A. & Nedergaard, M. Physiology of astroglia. *Physiol. Rev.* 98, 239–389 (2018).

41. Shigetomi, E. et al. Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J. Gen. Physiol.* 141, 633–47 (2013).
42. Panatier, A. et al. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146, 785–798 (2011).
43. Arizono, M. et al. Structural basis of astrocytic Ca²⁺ signals at tripartite synapses. *Nat. Commun.* 11, 1906 (2020).
44. Pirttimaki, T. M. et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. *PLoS One* 8, e81828 (2013).
45. Talantova, M. et al. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2518-27 (2013).
46. Kervern, M. et al. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors. *J Alzheimers Dis* 32, 183–196 (2012).
47. Jo, S. et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 20, 886–896 (2014).
48. Talavera, K. et al. Mammalian transient receptor potential TRPA1 channels: from structure to disease. *Physiol. Rev.* (2019).
49. Lee, S. M. et al. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* 45, 45–49 (2012).
50. Startek, J. B. et al. Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. *Elife* 8, (2019).
51. Rose, C. R. et al. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, (2018).
52. Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J. & Hol, E. M. Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 144, 121–141 (2016).
53. Lee, K.-I. et al. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 13, 92 (2016).
54. Bakker, A. et al. Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuron* 74, 467–474 (2012).
55. Pilipenko, V. et al. Neuroprotective action of diazepam at very low and moderate doses in Alzheimer's disease model rats. *Neuropharmacology* 144, 319–326 (2019).
56. Sanz-Blasco, S., Piña-Crespo, J. C., Zhang, X., McKercher, S. R. & Lipton, S. A. Levetiracetam inhibits oligomeric A β -induced glutamate release from human astrocytes. *Neuroreport* 27, 705–709 (2016).

57. Faivre, E. et al. Beneficial effect of a selective adenosine A2A receptor antagonist in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 11, (2018).
58. Koivisto, A., Jalava, N., Bratty, R. & Pertovaara, A. TRPA1 Antagonists for Pain Relief. *Pharmaceuticals* 11, 117 (2018).
59. Heber, S. & Fischer, M. J. M. Non-Analgesic Symptomatic or Disease—Modifying Potential of TRPA1. *Med. Sci.* 7, 99 (2019).
60. Atri, A. The Alzheimer's disease Clinical Spectrum. *Med. Clin. North Am.* 103, 263–293 (2019).
61. Schmidt, M., Dubin, A. E., Petrus, M. J., Earley, T. J. & Patapoutian, A. Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. *Neuron* 64, 498–509 (2009).
62. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One* 3, (2008).



Supplementary Figure 1 Acute HC030031 application reverses CA1 neuron and astrocyte abnormal activities in 1-month-old but not in 3-month-old APP/PS1-21 mice. **(a)** Impact of 40 μ M HC030031 applied during 5 min on the proportion of astrocyte arbor subregions displaying calcium activity and frequency of calcium activity in 1-month-old WT (dark grey; $n = 8$ from 6 mice) and APP/PS1-21 mice (cyan; $n = 9$ from 5 mice) highlighting a large reversal of astrocytic calcium activity signature in transgenic animals. **(b)** Impact of 40 μ M HC030031 applied during 5 min on sEPSCs frequency and amplitude in 1-month-old WT (dark grey; $n = 7$ from 5 mice) and APP/PS1-21 mice (cyan; $n = 8$ from 6 mice) showing a significant reversion of neuronal hyperactivity in transgenic mice. **(c)** Impact of 40 μ M HC030031 applied during 5 min on the proportion of astrocyte arbor subregions displaying calcium activity and frequency of calcium activity in 3-month-old WT (dark grey; $n = 8$ from 3 mice) and APP/PS1-21 mice (cyan; $n = 9$ from 5 mice) showing no influence on astrocyte activity at this stage. **(d)** Impact of 40 μ M HC030031 applied during 5 min on sEPSCs frequency and amplitude in 3-month-old WT (dark grey; $n = 6$ from 5 mice) and APP/PS1-21 mice (cyan; $n = 8$ from 5 mice) showing no effect on neuronal hypoactivity at this stage. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ (Mann-Whitney test).

Stage	Parameter	Condition	<i>p</i> value
1-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.8072
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg male <i>vs</i> Tg female	> 0.999
	Astrocyte active microdomains (%)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.1481
	Active microdomains frequency (calcium event /min)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.2506
3-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.5934
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.8851
6-month-old	Time to escape box (s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.6029
	Velocity (cm/s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.9998
	Latency to target area (s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.8702

Table 1 Statistical analysis of the sex influence on studied parameters in APP/PS1-21 mice injected with vehicle (Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test).

Stage	Parameter	Condition	<i>p</i> value
1-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.7108
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.3841
3-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg male <i>vs</i> Tg female	> 0.999
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.3976
	Astrocyte active microdomains (%)	Tg male <i>vs</i> Tg female	> 0.999
	Active microdomains frequency (calcium event /min)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.2358
6-month-old	Time to escape box (s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.5585
	Velocity (cm/s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.2062
	Latency to target area (s)	Tg male <i>vs</i> Tg female	0.2217

Table 2 Statistical analysis of the sex influence on studied parameters in APP/PS1-21 mice injected with HC030031 (Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s multiple comparisons test).

Stage	Parameter	Condition	<i>p</i> value
1-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg vs Tg + vehicle	0.7021
		WT vs WT + vehicle	0.3437
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg vs Tg + vehicle	> 0.999
		WT vs WT + vehicle	> 0.999
	Astrocyte active microdomains (%)	Tg vs Tg + vehicle	> 0.999
		WT vs WT + vehicle	> 0.999
Active microdomains frequency (calcium event /min)	Tg vs Tg + vehicle	0.3879	
	WT vs WT + vehicle	0.9761	
3-month-old	sEPSCs frequency (Hz)	Tg vs Tg + vehicle	> 0.999
		WT vs WT + vehicle	0.5131
	sEPSCs amplitude (pA)	Tg vs Tg + vehicle	> 0.999
		WT vs WT + vehicle	0.9271
6-month-old	Time to escape box (s)	Tg vs Tg + vehicle	>0.999
		WT vs WT + vehicle	>0.999
	Velocity (cm/s)	Tg vs Tg + vehicle	0.2239
		WT vs WT + vehicle	0.098
	Latency to target area (s)	Tg vs Tg + vehicle	>0.999
		WT vs WT + vehicle	0.2909

Table 3 Statistical analysis of the safety and inefficiency of the vehicle daily administration in APP/PS1-21 mice and their WT littermates (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test).

Etude des mécanismes associés à la perturbation des interactions entre astrocytes et neurones induite par A β

Les résultats présentés dans cette section correspondent à des résultats préliminaires permettant d'apporter des éléments de réponse à la question concernant les mécanismes mis en jeu dans la perturbation de la communication entre astrocytes et neurones induite par A β .

Dans un premier temps, nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par Serrano *et al.* 2006 et Panatier *et al.* 2011 pour bloquer l'excitabilité calcique dans le réseau astrocytaire du *stratum radiatum* en délivrant un chélateur calcique (BAPTA) au travers de la pipette de patch. Cette expérience nous a permis de mettre en évidence que l'hyperactivité neuronale induite par A β dans l'hippocampe est dépendante de la signalisation calcique astrocytaire.

Dans un second temps, l'étude de l'activité électrophysiologique spontanée des neurones de la région CA1 de l'hippocampe nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la fréquence des SICs, dans le cadre d'applications exogènes d'A β et chez des souris APP/PS1 âgées de 1 mois. L'inhibition du canal TRPA1 permet, dans les deux cas, un retour à une fréquence basale de ces courants. Compte-tenu des propriétés associées aux SICs, ces observations suggèrent une perturbation de la gliotransmission glutamatergique, avec une mise en jeu spécifique des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Pirttimaki, Hall and Parri 2011). Ces perturbations participent à l'hyperactivité observée dans les stades précoces de la maladie d'Alzheimer.

Enfin, nous avons utilisé la RgDAAO (*Rhodotorula gracilis D-amino acid oxidase*, collaboration Jean-Pierre Mothet) pour spécifiquement dégrader la D-sérine et étudier l'implication de ce gliotransmetteur dans l'hyperactivité neuronale induite par A β . Les résultats obtenus indiquent la nécessité de la présence de la D-sérine pour la mise en place de l'hyperactivité neuronale hippocampale et suggèrent également une implication des récepteurs NMDA dans ce processus.

Ces résultats appellent à être confirmés et appuyés par d'autres approches qui seront discutées dans la suite de ce manuscrit. Cependant, ils semblent indiquer un rôle essentiel de la gliotransmission dépendante du calcium dans l'hyperactivité neuronale précoce observée dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.

A β -induced neuronal hyperactivity is dependent on calcium activity in astrocyte network.

Based on work published in Serrano *et al.* 2006, we used BAPTA, a calcium chelator, to block selectively calcium dynamic in *stratum radiatum* astrocytes on acute brain slices. Briefly, an astrocyte was patched in whole-cell configuration with a pipette containing 10 mM BAPTA and 0.05 % biocytin. The astrocyte was kept patched during 15 min to allow dialysis of the intracellular medium with pipette solution, then the pipette was gently removed. A neighboring pyramidal neuron of the CA1 region was patched within the 20 following minutes and we recorded its spontaneous basal activity for 5 min. Then, sEPSCs were recorded with 100 nM A β in the bath or under physiological control conditions. After recording, slices were fixed in saline solution containing 4 % PFA and Streptavidin coupled with Alexa 488 fluorescent indicator was used to label biocytin and to confirm diffusion of the pipette solution through the astrocytic network (**Figure 31a**). We previously showed that 5 min application of 100 nM of A β was sufficient to induce a significant increase of sEPSC frequency (Bosson *et al.*, 2007). When calcium activity was blocked in astrocytes, A β application did not induced any sEPSC frequency increase compared to the initial baseline level (**Figure 31b**; 78.0 ± 9.2 % of baseline; $n = 8$ neurons from 5 animals; $p = 0.0006$). These observations suggested that A β -induced neuronal hyperactivity in hippocampus depends on neuron-astrocyte interactions and that astrocytes are directly involved in acute A β -induced synaptic toxicity.

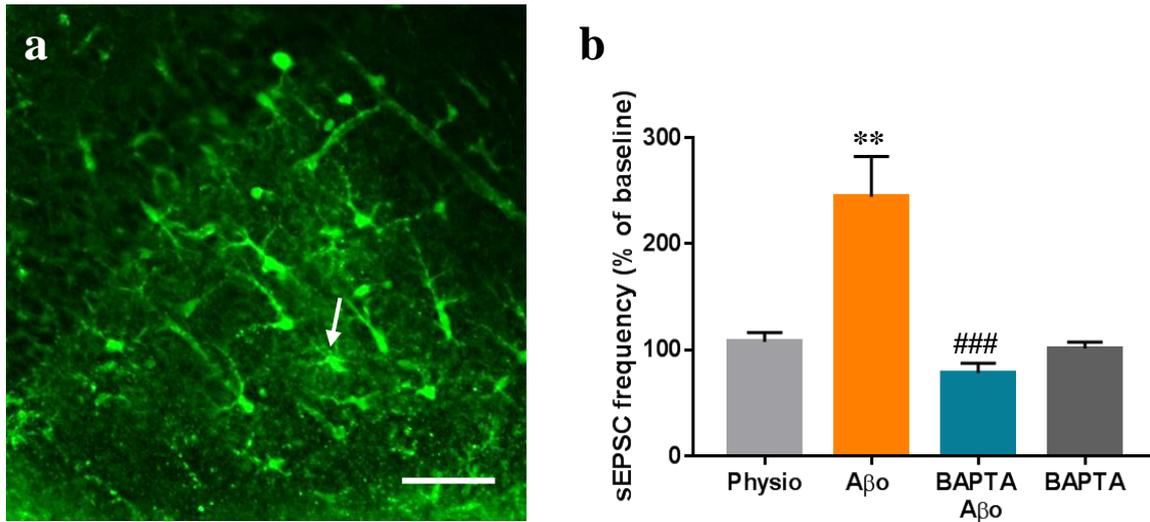


Figure 31: A β o-induced neuronal hyperactivity is dependent on calcium activity in the astrocyte network. (a) Alexa 488-coupled streptavidin labelling of biocytin (green) in the hippocampus on mice acute brain slice fixed after electrophysiological recording. Biocytin loading is performed by diffusion from a single patched astrocyte (white arrow). Scale bar: 50 μ m. **(b)** Histogram showing sEPSC frequency of 5 min recording in control condition (light grey; $n = 7$ neurons) or after 5 min application of 100 nM A β o (orange; $n = 7$ neurons; $p = 0.0041$) and following blockade of calcium activity in astrocytes (BAPTA + A β o in cyan; $n = 8$ neurons; $p = 0.0006$ and BAPTA alone in dark grey; $n = 8$ neurons). Baseline is recorded during 5 min under physiological condition of after BAPTA diffusion. Statistical analysis are performed using Mann-Whitney test. Results are compared with the physiological condition with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$, or with the A β o condition with #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ and ###, $p < 0.001$.

TRPA1 inhibition rescues A β o-induced increase of SICs frequency

Patch-clamp whole-cell configuration was used to record spontaneous activity of CA1 region pyramidal neurons in the hippocampus on mice acute brain slices. SICs were isolated from recordings using a high pass filter at 20 ms on rise time parameter. Since SICs are relative rare events, we analyzed cumulative frequency of these currents on 30 min recordings. Results obtained showed a not significant increase in the cumulative frequency when 100 nM A β o was bath applied during the recording compared to physiological condition (**Figure 32**; 1.8 ± 0.8 event/min after 30 min under A β o application *versus* 0.6 ± 0.2 event/min in physiological condition; $n = 5$ neurons from 4 animals and 4 neurons from 4 animals respectively; $p = 0.142$). Co-application of A β o with a TRPA1 inhibitor, HC030031 (named HC on graph), rescued SICs cumulative frequency toward physiological level (**Figure 32**; 0.5 ± 0.2 event/min after 30 min for A β o + HC; $n = 5$ neurons from 4 animals; $p = 0.026$). The samples size need to be increased but these results suggested an A β o-induced increase of glutamatergic gliotransmission targeting extra-synaptic NMDA receptors in neighboring neurons.

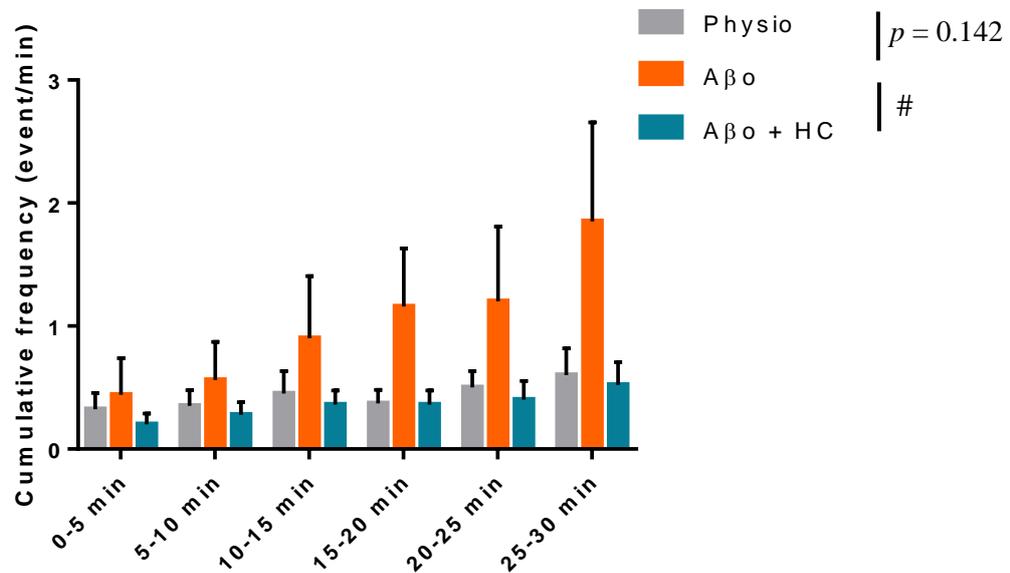


Figure 32: TRPA1 inhibition rescues A β o-induced increase of SICs frequency. Histogram of SICs cumulative frequency during a 30 min-recording of neuronal spontaneous activity within hippocampus CA1 region on mice acute brain slices. Application of 100 nM A β o in the bath induces a strong increase in SICs cumulative frequency (orange, $n = 5$) compared to physiological conditions (light grey, $n = 4$; $p = 0,142$). Co-application of A β o and HC030031 (40 μ M) blocks the increase of cumulative frequency (cyan, $n = 5$; $p = 0,026$). Statistical analysis are performed using Kolmogorov-Smirnov test. Results are compared with the physiological condition with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ or the A β o condition with #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ and ###, $p < 0.001$.

TRPA1 chronic inhibition rescues increase of SICs frequency in 1-month-old APP/PS1 mice

We previously showed that neuronal hyperactivity within the hippocampus in APP/PS1-21 mouse model at 1 month of age was prevented by daily injection of a TRPA1 inhibitor. Therefore, we also analyzed SICs cumulative frequency, as described above, on these treated mice. APP/PS1 mice injected with vehicle exhibited a significant increase in SICs cumulative frequency compared to WT mice injected with vehicle (**Figure 33**; 2.3 ± 0.6 event/min after 30 min in APP/PS1 mice injected with vehicle *versus* 0.6 ± 0.2 event/min for WT mice injected with vehicle; $n = 8$ neurons from 5 animals and $n = 6$ neurons from 4 animals respectively; $p = 0.002$). Chronic inhibition of TRPA1 with HC030031 injections blocked such increase in transgenic mice (**Figure 33**; 0.6 ± 0.1 event/min after 30 min in APP/PS1 mice injected with HC; $n = 11$ neurons from 5 animals; $p = 0.002$) and had no effect on WT mice (**Figure 33**; 0.6 ± 0.3 event/min after 30 min in WT mice injected with HC; $n = 3$ neurons from 2 animals; $p = 0.999$). These data suggested early impairments in glutamatergic gliotransmission, involving extra-synaptic NMDA receptors in Alzheimer transgenic mice model that could be rescued when blocking TRPA1 channels.

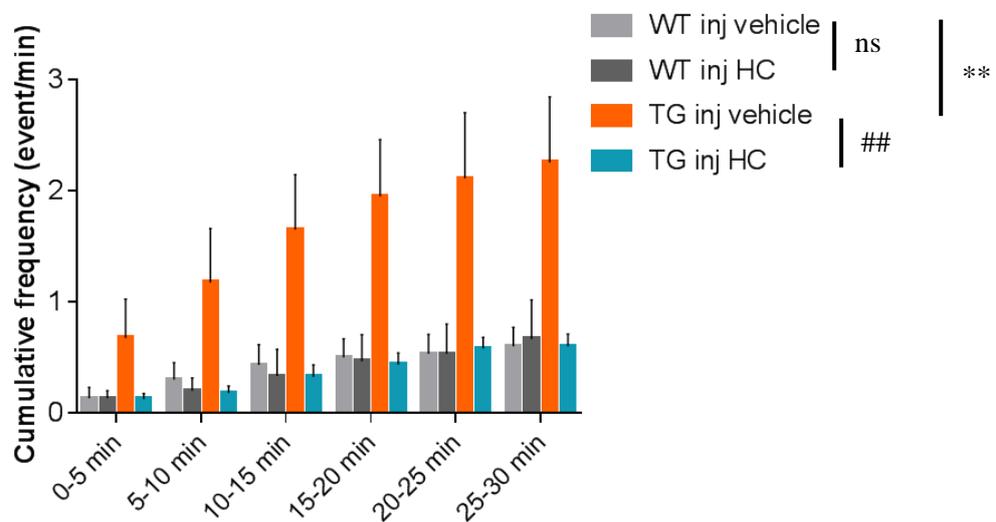


Figure 33: TRPA1 chronic inhibition rescues increase of SICs frequency in 1-month-old APP/PS1 mice. Histogram of SICs cumulative frequency during a 30 min-recording of neurons spontaneous activity, within hippocampus CA1 region on acute brain slices. SICs cumulative frequency is increased in APP/PS1 mice injected with vehicle (orange, $n = 6$) compared to WT mice injected with vehicle (light grey, $n = 3$; $p = 0.002$). Daily injections of HC030031 (5mg/kg body weight) rescue SICs frequency toward basal level in APP/PS1 mice (cyan, $n = 10$; $p = 0.002$), and show no effect on WT mice (dark grey, $n = 3$; $p = 0.999$). Statistical analysis are performed using Kolmogorov-Smirnov test for cumulative distribution analysis on 30 min-recording. Results are compared with the WT injected with vehicle with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$ or the APP/PS1 injected with HC condition with #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ and ###, $p < 0.001$. ns, not significant

A β -induced synaptic hyperactivity is dependent on D-serine

In the hippocampus, D-serine is the main co-agonist of NMDA receptor, and is specifically released by astrocytes (Papouin *et al.* 2017c). Therefore, to test whether D-serine is involved in A β -induced synaptic hyperactivity we used RgDAAO (D-amino acid oxidase purified from *Rhodotorula gracilis*), graciously given by Dr Jean-Pierre Mothet to selectively degrade D-serine. Mice acute brain slices were incubated with ACSF containing RgDAAO (0,2 U/mL) for at least 40 min before being used. Then, sEPSCs of neurons from the CA1 region were recorded under basal condition or with 100 nM application of A β in the bath. Results obtained showed that A β had a reduced effect on sEPSC frequency in these conditions (**Figure 34**; $n = 6$ neurons from 3 animals; $p = 0,073$) suggesting an involvement of D-serine in the mechanisms associated with A β -induced synaptic hyperactivity.

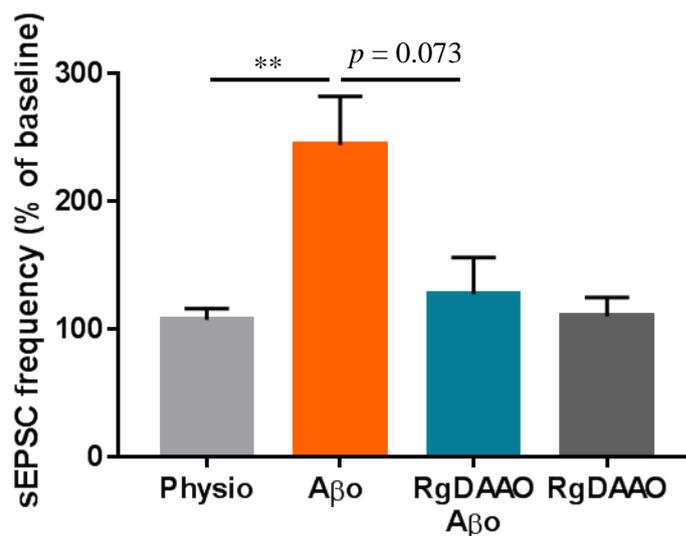


Figure 34: A β -induced neuronal hyperactivity is dependent on D-serine. Histogram showing CA1 pyramidal neuron sEPSC frequency during a 5 min-recording on mice acute brain slice in control condition (light grey; $n = 7$ neurons) or after 5 min application of 100 nM A β (orange; $n = 7$ neurons; $p = 0.004$) and the two same conditions following incubation with RgDAAO during 40 min (RgDAAO + A β in cyan; $n = 6$ neurons; $p = 0.073$ and control RgDAAO in dark grey; $n = 3$ neurons) Baseline is recorded during 5 min under physiological condition or after RgDAAO incubation. Statistical analysis are done using Mann-Whitney test. Results are compared with the physiological condition with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$, or with the A β condition with #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ and ###, $p < 0.001$.

DISCUSSION

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une longue phase préclinique insidieuse, d'apparence asymptomatique mais qui masque la présence de perturbations de l'homéostasie cérébrale. Cette phase préclinique a fait l'objet de diverses observations indiquant une hyperactivité au sein de l'hippocampe qui présage du déclin cognitif associé à la pathologie (Miller *et al.* 2008; Bakker *et al.* 2012; Haberman, Branch and Gallagher 2017). Les études menées sur des modèles animaux transgéniques, qui manifestent une surproduction du peptide A β , ont permis de confirmer cette hyperactivité neuronale hippocampique précoce et de désigner l'accumulation de formes solubles oligomériques du peptide comme élément déclencheur de cette perturbation (Busche *et al.* 2012; Zott *et al.* 2019). Le travail présenté dans cette thèse a permis de montrer que les mécanismes permettant la mise en place de cette hyperactivité neuronale par A β sont liés à un processus dépendant de la signalisation calcique astrocytaire *via* l'activation du canal TRPA1. L'inhibition pharmacologique chronique de ce canal chez le modèle murin APP/PS1-21, à partir du début de la surproduction d'A β , a permis de mettre en évidence un effet protecteur structural et fonctionnel des synapses des neurones de la région CA1 de l'hippocampe. Cet effet neuroprotecteur permet de prévenir également l'apparition de troubles liés à l'encodage de la mémoire de travail spatiale chez ces animaux. Ces résultats suggèrent donc un rôle majeur pour les astrocytes avec une implication du canal TRPA1 dans les tout premiers stades de la maladie d'Alzheimer. Les résultats obtenus posent plusieurs questions et ouvrent plusieurs perspectives dont certaines sont présentées ici.

A. Expression du canal TRPA1

Une des premières questions soulevées par le travail présenté dans ce manuscrit concerne l'expression du canal TRPA1 et notamment sa spécificité astrocytaire. Les travaux réalisés par Shigetomi *et al.* en 2012 et 2013 ont été les premiers à mettre en évidence l'implication de ce canal dans la signalisation calcique astrocytaire hippocampique, notamment au sein des microdomaines. Nos travaux ont permis de confirmer une implication fonctionnelle de TRPA1 dans un contexte pathologique en lien avec A β . Des expériences d'immunohistochimie réalisées sur des animaux APP/PS1 exprimant la protéine fluorescente YFP sous le promoteur Thy-1, ont permis de mettre en évidence une augmentation du marquage de TRPA1, tout autour des épines dendritiques dans l'hippocampe sur des animaux de 1 mois (**Figure 35**). Même si nous ne pouvons pas l'affirmer de manière certaine, ce profil de marquage semble cohérent avec une expression dans les prolongements astrocytaires péri-synaptiques. De plus,

Discussion

l'inhibition pharmacologique de TRPA1 permet d'empêcher la mise en place d'une hyperactivité à la fois neuronale et astrocytaire en présence d'A β . Or, nous avons montré que le blocage de l'excitabilité neuronale n'empêche pas la mise en place de l'hyperactivité calcique astrocytaire en présence d'A β , alors qu'à l'inverse le blocage de l'excitabilité calcique dans le réseau astrocytaire permet de bloquer l'effet hyperactivateur d'A β sur l'activité neuronale. Ces résultats suggèrent donc une implication fonctionnelle du canal TRPA1 spécifiquement au niveau des astrocytes de l'hippocampe, dans un contexte lié à l'accumulation d'A β . Nous confirmerons ces évidences fonctionnelles par des expériences d'hybridation *in situ* avec des transcrits de TRPA1 couplées à de l'immunofluorescence sur coupes de cerveaux de souris afin de vérifier son expression spécifiquement astrocytaire, à la fois en condition physiologique et dans le modèle de souris transgéniques APP/PS1.

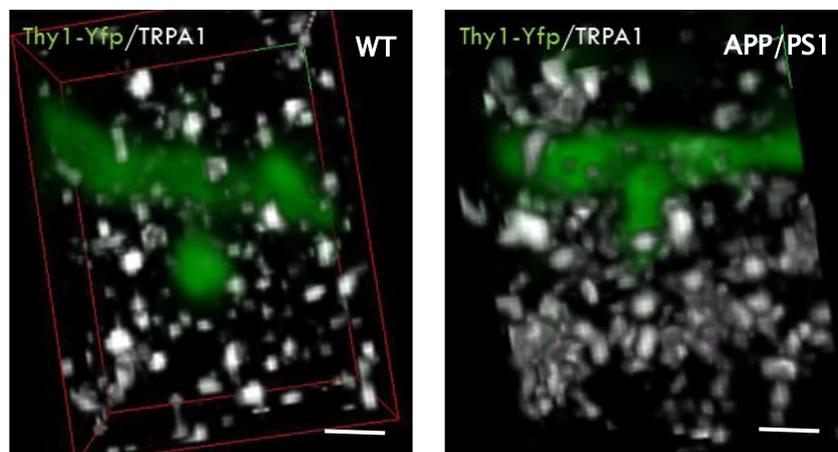


Figure 35: Expression du canal TRPA1 à proximité des épines dendritiques dans l'hippocampe de souris Thy1-YFP. Le croisement de la lignée de souris APP/PS1 avec une lignée Thy1-YFP exprimant YFP dans les neurones permet d'observer une expression ponctiforme du canal TRPA1 (blanc) à proximité des épines dendritiques (vert). On observe une augmentation de l'expression du canal TRPA1 entourant les épines dendritiques dans l'hippocampe de souris transgéniques (panneau de droite ; APP/PS1) par rapport aux animaux sauvages (panneau gauche; WT) sur des animaux âgés de 1 mois. Barre d'échelle 1 μ m.

Chez l'homme, les données présentées par le site *The Human Protein Atlas* (proteinatlas.org) n'indiquent aucune détection de la protéine TRPA1 et un très faible niveau d'ARN correspondant à la transcription du gène de TRPA1 au niveau du cerveau. Ces observations soulèvent des doutes quant à la transposabilité de notre étude chez l'homme. Cependant, nos travaux (Bosson *et al.* 2017) et ceux de Lee *et al.* 2016 ont mis en évidence une augmentation significative de l'expression de TRPA1 à la fois dans le cortex et dans l'hippocampe chez deux modèles différents de souris APP/PS1 (APP/PS1-21 et APP/PS1 Δ 9 respectivement). Même si

le canal TRPA1 semble peu ou pas présent en condition physiologique dans le cerveau chez l'homme, il serait intéressant d'étudier son expression sur des échantillons provenant de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou présentant des MCI. De plus, sur notre modèle APP/PS1-21, cette augmentation d'expression du canal TRPA1 a été mise en évidence chez des animaux de moins d'un mois, soit très peu de temps après le début de la surproduction d'A β (Bosson *et al.* 2017). L'augmentation d'expression de TRPA1 pourrait donc être envisagée comme un marqueur précoce associé à l'accumulation de formes solubles oligomériques d'A β .

B. Perturbations de la plasticité et des performances mnésiques

La maladie d'Alzheimer est associée à une perturbation de l'homéostasie synaptique, ce qui semble affecter l'activité des récepteurs NMDA et donc les mécanismes de plasticité associés. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence des altérations des mécanismes de LTP et une facilitation des mécanismes de LTD chez l'animal, dans des contextes associés à la maladie d'Alzheimer (pour revue voir Li and Selkoe 2020). Dans notre étude, aucune donnée sur la plasticité n'a été présentée et ce pour plusieurs raisons.

Concernant l'étude des animaux APP/PS1-21, il a été montré que ces souris semblent présenter des altérations de la LTP à partir de 8 mois (Gengler, Hamilton and Ho 2010). Or tous nos travaux portent sur des stades antérieurs à 6 mois. A ces stades, nous n'avons mis en évidence aucune perturbation de la potentialisation synaptique au sein du laboratoire (Fabien Lanté, communication personnelle). Par contre, nous avons observé une perte synaptique ainsi qu'une hypoactivité à partir de 3 mois chez ces animaux. Il est intéressant de préciser que les épines dendritiques matures (de type *mushroom*) résiduelles à 3 mois, semblent avoir une taille augmentée. Ces synapses matures persistantes seraient donc pleinement fonctionnelles, ce qui suggère la présence de mécanismes capables de compenser les perturbations synaptiques qui prennent place. Cela pourrait expliquer la survenue tardive des perturbations de la plasticité et des performances cognitives dans ce modèle, par rapport aux perturbations de l'activité synaptique spontanée mises en évidence dès 1 mois. La capacité des synapses à maintenir une forme de plasticité compensatrice expliquerait ainsi la longue phase asymptomatique de la maladie d'Alzheimer. En revanche, une facilitation des mécanismes de LTD à un stade précoce pourrait être corrélée à la mise en jeu des récepteurs NMDA extra-synaptiques dans un contexte excitotoxique et être impliquée dans la perte de synapses et à l'hypofonctionnalité observée à 3 mois. Cela n'a pour le moment pas encore été mis en évidence et des études sont en cours à ce sujet au sein du laboratoire.

Concernant le canal TRPA1, les travaux de Shigetomi *et al.* 2013 avaient montré que l'activité du canal est impliquée dans la LTP au sein de l'hippocampe *via* la libération de D-sérine. Nous avons réalisé des expériences préliminaires au sein du laboratoire confirmant que l'inhibition de TRPA1 perturbe la LTP en condition basale. Ces observations pourraient laisser supposer un effet délétère de l'inhibition chronique de TRPA1 sur la plasticité synaptique, pouvant expliquer le maintien de troubles mnésiques chez les animaux APP/PS1 traités avec l'inhibiteur de ce canal dans le cadre de notre étude. Cependant, une étude récente a mis en évidence que le protocole de LTP couramment utilisé, basé sur de la stimulation à haute fréquence (HFS) des afférences, induit un retrait des prolongements astrocytaires qui enrobent les synapses et un débordement de glutamate en dehors de la synapse, ce qui favorise l'activation de NMDAR extra-synaptiques (Henneberger *et al.* 2020). Or, l'augmentation du *spill-over* de glutamate liée à la baisse de l'enrobage astrocytaire dans l'hippocampe a été associée à la perturbation de la mémoire spatiale chez la souris (Tanaka *et al.* 2013). Ces résultats remettent donc en question le lien qui est souvent fait entre le modèle de LTP étudié par HFS et la plasticité synaptique désignée comme corrélât moléculaire de la mémoire. Au regard de ces informations, il paraît donc difficile de conclure quant à un lien entre les perturbations de LTP, étudiée par HFS, induites par l'inhibition de TRPA1 et un effet délétère pouvant expliquer la persistance de défauts mnésiques des animaux traités chroniquement avec l'inhibiteur de ce canal. Des expériences complémentaires utilisant d'autres protocoles de LTP (notamment théta burst) sont en cours au sein du laboratoire.

Nos travaux ont permis de montrer que l'inhibition pharmacologique chronique du canal TRPA1 à partir du début de la surproduction du peptide A β dans le modèle APP/PS1-21, permet de restaurer plusieurs paramètres fonctionnels et morphologiques associés au développement de la pathologie, permettant ainsi de corriger les défauts d'apprentissage observés dans ce modèle murin à 6 mois. Cependant, les troubles de la mémoire de référence sont toujours observables à ce stade, ce qui suggère la persistance d'autres mécanismes physiopathologiques affectant la constitution de la mémoire de référence.

Les travaux publiés par Lee *et al.* en 2016 ont montré que le croisement d'animaux TRPA1-KO avec des animaux APP/PS1 Δ 9 permet de corriger les troubles d'apprentissage et de mémoire spatiale dans ce modèle à 8 mois. La première hypothèse permettant d'expliquer le maintien de troubles mnésiques dans notre étude, serait de désigner un problème de pharmacocinétique lié à nos injections quotidiennes d'une dose de 5 mg/kg ne permettant pas une inhibition suffisamment complète du canal pour bloquer tous les mécanismes perturbateurs.

D'un autre côté, la méthode de traitement utilisée s'est avérée suffisante pour corriger une bonne partie des dysfonctions cellulaires ainsi que des atteintes morphologiques et biochimiques identifiées sur le modèle APP/PS1-21, ce qui laisse penser que la couverture pharmacologique pour l'inhibition chronique du canal TRPA1 était suffisante. La deuxième hypothèse pour expliquer le maintien de ces troubles mnésiques dans ce modèle suggère l'existence de mécanismes physiopathologiques, qui ne seraient pas subséquents à l'activation TRPA1 dans les phases précoces et qui impliqueraient d'autres voies de signalisation. Les travaux réalisés par le laboratoire du professeur Gabor Petzold, portant sur le même modèle murin que le nôtre, mettent en évidence une hyperactivité calcique au sein d'astrocytes réactifs se trouvant à proximité des plaques, dans le cortex d'animaux de plus de 5 mois, associée à une perturbation du contrôle de la vascularisation par les astrocytes (Delekate *et al.* 2014). Ils avaient alors identifié l'implication du récepteur P2Y1 dans ce mécanisme. Récemment, ils ont publié une étude montrant qu'un traitement longue durée avec un antagoniste de P2Y1R permet de corriger les déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale des souris APP/PS1-21 (Reichenbach *et al.* 2018). Par ailleurs, nous avons montré que les astrocytes hippocampiques des souris APP/PS1 âgées de 3 mois, étaient hyperactifs mais que l'application aigüe de l'inhibiteur de TRPA1 ne permettait plus de corriger cette hyperactivité. Réunis ensemble, ces éléments indiquent une évolution au cours du temps des acteurs moléculaires impliqués dans la perturbation de la signalisation calcique astrocytaire. Dans notre étude, nous avons observé que l'inhibition chronique du canal TRPA1 permet de restaurer l'activité calcique astrocytaire jusqu'à 3 mois mais cela n'exclut pas l'apparition plus tardive d'une hyperactivité astrocytaire à proximité des plaques, indépendante de TRPA1 et impliquant P2Y1R. Nous pouvons donc supposer que l'implication plus tardive de cet acteur pourrait être responsable de perturbations pouvant affecter la vascularisation et le métabolisme énergétique et donc *in fine* les mécanismes associés à la mémoire de référence.

C. Perturbations de la balance excitation/inhibition

Les travaux présentés dans ce manuscrit étudient l'implication astrocytaire dans les perturbations synaptiques glutamatergiques de la région CA1 de l'hippocampe. Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau. Or, le système exciteur est contrebalancé par un système inhibiteur, médié par le GABA, permettant un équilibre essentiel pour la coordination du réseau neuronal (Klausberger and Somogyi 2008). Une altération des interneurons a ainsi été associée à des troubles cognitifs dans plusieurs maladies neurologiques ou psychiatriques comme l'épilepsie, l'autisme, la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer

(pour revue voir Palop and Mucke 2016). Des analyses par électroencéphalographie de cerveaux de souris ont permis de montrer que les interneurons sont notamment impliqués dans la génération d'oscillations gamma dans l'hippocampe qui interviennent dans l'encodage de la mémoire spatiale (Mann and Paulsen 2007) et le rôle de ces oscillations gamma dans la mémoire hippocampique a été confirmé chez l'homme (Sederberg *et al.* 2007). De manière intéressante, des études réalisées sur des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer mettent en évidence une altération des oscillations gamma avec des périodes très brèves d'augmentation de ces oscillations et des périodes longues de diminution (Verret *et al.* 2012). Or, la diminution des oscillations gamma est favorable à l'apparition d'activités épileptiformes (Palop and Mucke 2016) et pourrait donc être mise en relation avec l'augmentation de l'incidence de crises d'épilepsie observées rétrospectivement pendant les phases précliniques des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Vossel *et al.* 2016).

Par ailleurs, les interneurons GABAergiques font l'objet d'une grande hétérogénéité et interviennent dans une régulation spatio-temporelle fine des neurones pyramidaux glutamatergiques (Klausberger and Somogyi 2008). Récemment, il a été montré dans l'hippocampe de souris que les astrocytes interviennent dans la modulation de ce système inhibiteur en augmentant l'inhibition des neurones pyramidaux par les interneurons exprimant la somatostatine *via* la libération d'ATP (Matos *et al.* 2018). Par ailleurs, un dysfonctionnement des interneurons exprimant la somatostatine a été observé dans un modèle de souris APP/PS1 et décrit comme impliqué dans des altérations mnésiques observées sur ce modèle (Schmid *et al.* 2016). De plus, les astrocytes sont également impliqués dans le système inhibiteur en libérant directement du GABA *via* le canal Best-1 et des perturbations de ce mécanisme ont été observées dans des astrocytes hippocampiques de souris APP/PS1 (Jo *et al.* 2014). Ces observations suggèrent donc qu'une perturbation du système inhibiteur dans l'hippocampe, *via* une altération de la physiologie astrocytaire induite par l'accumulation d'A β , pourrait contribuer à l'hyperactivité excitatrice précoce que nous avons observée dans notre étude. Des études très préliminaires réalisées au sein de notre équipe semblent confirmer l'implication d'un tel mécanisme puisqu'ils montrent une diminution d'amplitude des courants spontanés inhibiteurs post-synaptiques (sIPSCs) enregistrés dans les neurones pyramidaux de la région CA1 sur notre modèle APP/PS1 (Floriane Payet, communication personnelle).

D. Vers un diagnostic de plus en plus précoce

L'implication des astrocytes dans des perturbations neuronales, dès le début de la surproduction du peptide A β dans le modèle APP/PS1-21, semble confirmer une mise en place très précoce

de mécanismes délétères synaptotoxiques. Or, l'inhibition pharmacologique chronique du canal TRPA1 réalisée dans notre étude, suggère que le ciblage de ces perturbations précoces permet d'éviter la mise en place de plusieurs perturbations fonctionnelles et morphologiques dans l'hippocampe, allant jusqu'à la prévention des troubles d'apprentissage. Ces résultats suggèrent un rôle critique de ces phases très précoces dans la cascade pathogénique associée à la maladie d'Alzheimer. Ce constat pose donc la question de la capacité à détecter suffisamment tôt des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, pour permettre de ralentir ou stopper efficacement cette cascade pathogénique.

Le dosage des biomarqueurs historiques de la maladie d'Alzheimer ($A\beta$ et tau) dans le LCS a démarré au début des années 90. Il constitue encore à l'heure actuelle le meilleur outil de prédictibilité de la pathologie et s'avère plus sensible que l'imagerie *PET-scan* (Walsh and Selkoe 2020). Cependant, pour réaliser ce dosage il faut réaliser plusieurs ponctions lombaires pour suivre l'évolution de ces marqueurs alors qu'il s'agit d'un acte médical invasif et douloureux. Le recours à ce type de prélèvements se fait donc dans des contextes cliniques particuliers, ce qui n'est pas compatible avec un diagnostic précoce facilité. La communauté scientifique s'attèle donc à identifier de nouveaux moyens d'identifier des marqueurs de prédictibilité d'évolution vers la maladie d'Alzheimer.

Une des stratégies prometteuses étudie l'évolution de marqueurs sanguins (pour revue voir Walsh and Selkoe 2020). Notamment, la quantité d'un épitope phosphorylé de tau p181 semble être spécifiquement plus élevée dans le cas de la maladie d'Alzheimer et son évolution semble avoir une bonne corrélation avec l'évolution de la maladie. Une modification du niveau de ce marqueur a même pu être observée avant la détection de plaques amyloïdes par *PET-scan* ce qui permet d'espérer un diagnostic précoce. D'autres épitopes ou fragments de tau sont également à l'étude.

Une autre stratégie intéressante s'appuie sur l'étude du système nerveux entérique. En effet, des expériences réalisées dans des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer ont mis en évidence une forte expression d'APP au niveau des neurones présents dans le tube digestif avec des altérations importantes du système nerveux entérique (Semar *et al.* 2013). De manière intéressante, ces altérations surviennent de manière très précoce avec pour conséquence une perturbation de la motilité du tractus digestif, associée à une forte inflammation (Semar *et al.* 2013). Les troubles digestifs pourraient donc constituer un symptôme préclinique annonciateur de la pathologie. Ces observations peuvent être mises en parallèle avec des résultats indiquant une modification du microbiote intestinal chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

et l'identification de marqueurs microbiotiques pourraient permettre la réalisation de diagnostics facilités et non invasifs par analyse de selles (Shen and Ji 2019). Enfin, au sein de notre équipe, une étude longitudinale a été réalisée sur notre modèle souris APP/PS1 entre 1 et 9 mois. Cette étude a permis de mettre en évidence une accumulation de formes fibrillaires d'A β ₁₋₄₂ au niveau des cryptes intestinales dès 2 mois, ainsi qu'une désorganisation de la barrière épithéliale à partir de 3 mois. L'absence de plaques au niveau intestinal a conduit à formuler l'hypothèse qu'il existe probablement un mécanisme de clairance efficace dans cette structure. Des expériences de dosage d'A β dans des échantillons de fèces ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de formes oligomériques solubles du peptide à 1 mois pour les souris APP/PS1 par rapport aux WT (Muriel Jacquier-Sarlin, communication personnelle). Ces résultats permettent d'espérer le développement d'outils diagnostiques précoces et simples à mettre en œuvre visant à doser le peptide A β directement dans les selles.

E. Perspectives

1. Etude des mécanismes impliqués dans le déclenchement de l'hyperactivité neuronale précoce

Une des perspectives du projet s'inscrit dans la continuité de la dernière partie des résultats présentée dans ce manuscrit. L'objectif consiste à identifier les mécanismes et les acteurs moléculaires couramment mis en œuvre au sein de la synapse tripartite, impliqués dans la mise en place de l'hyperactivité neuronale associée à l'hyperactivité calcique astrocytaire induite par A β .

Nos résultats montrent que l'hyperactivité neuronale induite par A β dépend de la signalisation calcique astrocytaire. En effet, la chélation du calcium intracellulaire au sein du réseau astrocytaire dans l'hippocampe par le BAPTA bloque la mise en place de l'hyperactivité des neurones pyramidaux de la région CA1 induite par 5 min d'application d'A β à 100 nM. Ces résultats nous permettent de supposer que la mise en place de l'hyperactivité neuronale fait intervenir des mécanismes de libération de gliotransmetteurs qui sont dépendants du calcium. La voie de gliotransmission majoritaire dépendante du calcium fait intervenir l'exocytose de vésicules impliquant les complexes de fusion membranaire SNARE (Araque *et al.* 2000; Bergersen *et al.* 2012). Dans le but d'étudier l'implication de ce mécanisme, notre laboratoire a pu récupérer des souris dnSNARE auprès du laboratoire du Dr. Nicolas Toni (Center for Psychiatric Neurosciences, Lausanne University Hospital, Switzerland). Ces souris transgéniques possèdent un gène qui exprime un dominant négatif pour une protéine du

complexe SNARE, la synaptobrévine II. L'expression de ce gène est inductible et se trouve sous le contrôle du promoteur de la GFAP, ce qui permet d'induire un blocage de fusion vésiculaire spécifiquement au sein de la population astrocytaire (Pascual *et al.* 2005). L'application d'A β sur des tranches aigües provenant de cerveaux de ces souris, nous permettra donc d'étudier l'implication de la gliotransmission par voie vésiculaire dans l'hyperactivité neuronale.

Parmi les mécanismes de libération de gliotransmetteurs dépendants du calcium, nous avons évoqué en introduction le canal Best-1, activé par des variations de calcium intracellulaire (Han *et al.* 2013a). En conditions physiologique, ce canal est exprimé au niveau des microdomaines astrocytaires dans l'hippocampe et est impliqué dans une libération de glutamate permettant la modulation de la transmission synaptique. Chez des animaux APP/PS1 de 8 mois, ce canal se retrouve majoritairement exprimé au niveau de la membrane somatique des astrocytes réactifs et semble plutôt responsable d'une libération de GABA (Oh and Lee 2017). Ces observations font de ce canal un candidat intéressant à étudier qui pourrait correspondre à l'évolution du phénotype pathologique que nous avons observée sur notre modèle APP/PS1: une hyperactivité neuronale et astrocytaire à 1 mois, puis une hypoactivité neuronale associée à une hyperactivité astrocytaire à 3 mois. L'antagoniste de Best-1, le NPPB (*5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid*), a été utilisé dans plusieurs travaux pour étudier ce canal (Oh and Lee 2017). Nous avons donc réalisé des études préliminaires sur l'effet de cet antagoniste sur l'hyperactivité neuronale induite par l'application d'A β . Cependant, les résultats obtenus font l'objet d'une grande variabilité et semblent difficilement interprétables. Une explication possible pourrait être liée au fait que le NPPB n'est pas spécifique de Best-1 et bloque tous les canaux anioniques dépendants du Ca²⁺ (Oh and Lee 2017). L'approche développée par Lee *et al.* 2010, utilisant un ARN interférant sous promoteur astrocytaire pour altérer l'expression du canal spécifiquement dans les astrocytes semble être plus pertinente pour permettre d'étudier l'implication de ce canal dans nos conditions. Une autre possibilité serait d'étudier et de comparer les effets obtenus avec le NPPB avec les effets de l'acide niflumique ou l'acide flufénamique, deux antagonistes à large spectre des canaux chlorures permettant de bloquer Best-1 par un autre mécanisme que le NPPB (Park *et al.* 2009).

Concernant les transmetteurs impliqués dans les mécanismes associés à l'hyperactivité neuronale induite par A β , les courants mesurés correspondent à une activation de récepteurs du glutamate. Nous pouvons donc imaginer qu'une libération importante de glutamate est mise en jeu dans cette hyperactivité neuronale. La question qui se pose est d'identifier l'origine de

ce glutamate. Nous avons vu que la fréquence des SICs est significativement plus importante en présence d'A β ou à 1 mois chez les souris APP/PS1. Cette observation confirme qu'une partie de la gliotransmission glutamatergique est altérée dans nos conditions. Cependant les SICs sont des courants relativement rares, associés à un mécanisme particulier encore mal compris, qui ne permettent d'expliquer qu'une petite partie de l'hyperactivité neuronale observée. D'après les travaux de Zott *et al.* 2019, une activité neuronale préexistante est nécessaire pour la mise en place de l'hyperactivité neuronale induite par A β . La majeure partie des courants mesurés dans ce contexte hyperactif, non imputable aux SICs, peut donc provenir d'un effet pré-synaptique de l'astrocyte, impliqué alors dans une boucle d'amplification de la libération de glutamate à partir de l'élément pré-synaptique, et/ou d'une libération importante de glutamate directement depuis le partenaire astrocytaire en réponse à la détection d'une activité synaptique préexistante.

Dans le cas d'un effet pré-synaptique des astrocytes, on peut imaginer que l'activité synaptique induit une activation des récepteurs mGluR5 et que cela entraîne une libération d'ATP qui active en retour les récepteurs à l'adénosine A_{2A} présynaptiques (Panatier *et al.* 2011). Dans le contexte d'une hyperactivité calcique médiée par l'activation du canal TRPA1, on pourrait avoir une réponse astrocytaire aberrante, déclenchant ainsi l'hyperactivité neuronale observée en présence d'A β . De manière intéressante, la consommation de caféine qui est un antagoniste des A_{2A}R, semble réduire les risques de développer la maladie d'Alzheimer et le traitement chronique d'animaux APP/PS1 entre 3 et 9 mois avec un antagoniste spécifique de ce récepteur, a permis de mettre en évidence une prévention des déficits mnésiques chez ces animaux (Faivre *et al.* 2018). Il existe également au niveau de l'élément pré-synaptique des récepteurs du glutamate et notamment des récepteurs du kaïnate dont l'activation induit une facilitation de la libération de glutamate (pour revue voir Rodríguez-moreno and Sihra 2011). Un autre mécanisme impliqué dans cette boucle d'amplification pourrait être l'activation de ces récepteurs pré-synaptiques par une libération de glutamate astrocytaire.

Par ailleurs, nos résultats préliminaires sur la dégradation de la D-sérine extracellulaire avec la RgDAAO suggèrent que ce gliotransmetteur est également impliqué dans l'hyperactivité neuronale induite par A β . Cela semble confirmer une implication des récepteurs NMDA dans cette hyperactivité, ce qui est cohérent avec les défauts de plasticité associés à A β (Li and Selkoe 2020). Pour confirmer une augmentation de la disponibilité de la D-sérine induite par A β , nous envisageons d'étudier le taux d'occupation des récepteurs NMDA par cette dernière (Panatier *et al.* 2006). Pour cela, après application ou non d'A β sur des tranches aigües de

cerveau de souris, nous allons mesurer l'effet d'application exogène de D-sérine sur de potentiels de champs post-synaptiques excitateurs (fEPSPs) dans l'hippocampe, médiés uniquement par les récepteurs NMDA. Si A β induit une augmentation de libération de D-sérine, les résultats attendus devraient montrer un effet moindre de l'ajout de D-sérine sur les fEPSPs, traduisant une plus grande disponibilité initiale par rapport aux conditions sans A β .

2. Etude de l'activation de TRPA1 par A β

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que l'hyperactivité calcique astrocytaire induite par A β , dépend de l'activation du canal TRPA1. La question soulevée par cette observation est de savoir par quel moyen A β déclenche l'activation de ce canal.

Dans une publication récente, les auteurs spéculent sur la forte hydrophobicité des oligomères d'A β et donc sur leur capacité à lier les lipides membranes et perturber la fluidité de la membrane plasmique (Li and Selkoe 2020). Or, le canal TRPA1 a été décrit comme mécano-senseur, grâce aux répétitions ankyrines (Nilius, Appendino and Owsianik 2012). A β pourrait alors déclencher l'activation du canal TRPA1 en provoquant un étirement de la membrane plasmique. De plus, il a été montré que la localisation membranaire de TRPA1 se situe au niveau de domaines riches en cholestérol et que son activité est modulée directement par des interactions avec le cholestérol (Startek *et al.* 2019). Cette hypothèse est d'autant plus intéressante qu'elle permettrait d'établir un lien avec le métabolisme lipidique et APOE, qui est majoritairement produit par les astrocytes au sein du SNC et dont l'allèle ϵ 4 constitue le principale facteur de risque génétique dans les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer (Yu, Tan and Hardy 2014; Mahoney-Sanchez *et al.* 2016).

Afin de décrypter le mécanisme d'activation de TRPA1 par A β , nous avons établi une collaboration avec le laboratoire du Dr. Christophe Moreau (Institut de Biologie Structurale, Grenoble), spécialiste du modèle d'ovocyte de Xénope qui permet l'expression hétérologue et la caractérisation fonctionnelle de canaux ioniques. Nous pourrions alors faire exprimer le canal TRPA1 par ces ovocytes, appliquer de l'A β et jouer sur la composition membranaire en cholestérol ou dépléter la membrane en radeaux lipidiques, pour caractériser les mécanismes d'activation de TRPA1 en mesurant en temps réel les courants liés à l'ouverture de ce canal.

F. Hypothèses évolutives d'un rôle de premier plan pour l'astrocyte dans les troubles cognitifs

Une des remarques qui est souvent adressée aux travaux réalisés sur les rongeurs concerne la transposabilité des données chez l'homme, étant donné que les rongeurs ne développent pas

spontanément de pathologies similaires à la maladie d'Alzheimer. Une des explications qui est couramment avancée consiste à dire que l'espérance de vie des rongeurs n'est pas suffisamment longue pour permettre le développement de ce genre de pathologie du vieillissement. Cet argument semble cependant spéculatif. En effet, chaque animal dispose de sa propre vitesse de vieillissement qui est proportionnelle à son espérance de vie. Il a ainsi été observé chez la souris, une grande variété de pathologies spontanées non infectieuses liées au vieillissement comme de l'ostéoporose, de l'insuffisance rénale, la survenue de différents types de cancer, etc (pour revue voir Brayton 2013). Dans ce cas, comment expliquer l'absence de la survenue spontanée de maladies neurodégénératives similaires à la maladie d'Alzheimer chez ces animaux ? Les neurones semblent très similaires dans leur morphologie et leurs fonctions au cours de l'évolution. A l'inverse, il existe de grandes divergences morphologiques et fonctionnelles concernant les astrocytes en fonction du niveau d'évolution des espèces (Verkhatsky and Nedergaard 2018). Il paraît donc intéressant de se pencher sur les différences entre astrocytes murins et astrocytes humains.

Des observations ont mis en évidence que les astrocytes protoplasmiques humains sont environ 3 fois plus gros avec une arborisation 10 fois plus complexe que leurs homologues murins (Oberheim *et al.* 2006, 2009). Par ailleurs, une étude comparative entre des cerveaux de primates non humains (*Cebus apella* et *Saimiri sciureus*) et des cerveaux de rats, avait mis en évidence une organisation et une morphologie plus complexes des astrocytes dans le cortex des primates (Colombo 1996). Ces éléments suggèrent donc une complexification évolutive de la morphologie des astrocytes. Afin d'évaluer si cette évolution morphologique astrocytaire a permis d'accroître les compétences fonctionnelles du cerveau, des travaux ont entrepris de greffer des cellules progénitrices gliales humaines dans le cerveau de souris immunodéficientes (Han *et al.* 2013b). Les résultats obtenus ont permis d'observer une amélioration de la plasticité, mise en évidence par des études de LTP, et une amélioration de l'apprentissage, mise en évidence par différents tests de mémoire spatiale (Han *et al.* 2013b), ce qui semble confirmer le rôle central des astrocytes dans les fonctions cognitives.

En parallèle, sur le plan pathologique, on retrouve le même genre de gradation des atteintes cognitives en fonction du niveau d'évolution des espèces. Ainsi, les deux marqueurs de la maladie d'Alzheimer (plaques amyloïdes et enchevêtrements neurofibrillaires) ont pu être observés dans des cerveaux d'animaux très évolués comme les chimpanzés (Edler *et al.* 2017) qui sont associés à une forte astroglie (Munger *et al.* 2018), ou les dauphins (Davis *et al.* 2019). Dans le cas d'espèces un peu moins évoluées comme le chien ou le chat, des troubles

cognitifs regroupées sous le terme de syndrome de dysfonctions cognitives (SDC) ont été observées chez des animaux âgés mais aucun marqueur de la maladie d'Alzheimer n'a été observé (Landsberg and Nichol 2012). Enfin chez le rongeur, aucune atteinte cognitive spontanée n'a été rapportée et les seuls troubles neurodégénératifs constatés ciblent les fonctions motrices (Brayton 2013).

Réunis ensemble, ces éléments nous permettent de spéculer sur un rôle de premier plan pour l'astrocyte dans la survenue de troubles neurodégénératifs cognitifs liés au vieillissement, dont la maladie d'Alzheimer correspond aux formes les plus ultimes et semble réservée aux espèces possédant les astrocytes les plus complexes.

G. Conclusion

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence une hyperactivité calcique astrocytaire impliquée dans la mise en place d'une hyperactivité neuronale très précoce dans l'hippocampe sur un modèle murin de la maladie d'Alzheimer à un mois, induite par la présence de formes solubles oligomériques du peptide. Dans ce modèle, cette hyperactivité, laisse place progressivement à une hypoactivité neuronale observable à 3 mois et associée à une diminution du nombre d'épines dendritiques. Dans le même temps, alors que l'enrobage des synapses par les astrocytes diminue, ces derniers restent hyperactifs et font l'objet d'un début d'astrogliose. Enfin à 6 mois, les animaux présentent des déficits cognitifs liés à l'encodage et au stockage de la mémoire, mis en évidence par un test de mémoire spatiale faisant intervenir l'hippocampe.

Dans ce contexte, le canal calcique TRPA1 s'est avéré être une cible intéressante, dont l'inhibition pharmacologique permet d'éteindre l'hyperactivité calcique astrocytaire précoce et de ramener l'activité neuronale à un niveau basal. L'inhibition chronique de ce canal, à partir de cette phase précoce a ainsi permis de bloquer la cascade conduisant aux observations physiopathologiques qui avaient été faites chez ces animaux à 3 mois et de restaurer les déficits mnésiques liés à l'apprentissage à 6 mois. Néanmoins, des perturbations liées au stockage de la mémoire demeurent, malgré l'inhibition chronique de TRPA1.

Plusieurs questions subsistent quant à l'expression et l'activation du canal TRPA1 dans ce contexte lié à la présence de formes solubles oligomériques d'A β et quant à la persistance de certains troubles mnésiques. Cependant, notre étude a permis de souligner l'importance de cette hyperactivité calcique astrocytaire très précoce dans la pathogénèse associée à la maladie d'Alzheimer. En parallèle, des données prometteuses sortent sur l'élaboration de méthodes de diagnostics précoces, permettant d'espérer la possibilité d'une intervention médicale

Discussion

préclinique pour cette pathologie. Le développement de stratégies thérapeutiques, ciblant cette hyperactivité calcique astrocytaire précoce, offre donc de nouvelles perspectives intéressantes pour pouvoir proposer un traitement neuroprotecteur permettant de ralentir ou de stopper la progression de la maladie d'Alzheimer.

REFERENCES

- Abramov E, Dolev I, Fogel H *et al.* Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2009;**12**.
- Adamsky A, Kol A, Kreisel T *et al.* Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 2018;**174**:59-62.e14.
- Allen NJ, Barres BA. Glia - more than just brain glue. *Nature* 2009;**457**:675–7.
- Allen NJ, Bennett ML, Foo LC *et al.* Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature* 2012;**486**:410–4.
- Alvarez JI, Dodelet-devillers A, Kebir H *et al.* The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence. *Science* 2011;**334**:1727–32.
- Amadoro G, Ciotti MT, Costanzi M *et al.* NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:2892–7.
- Amar F, Sherman MA, Rush T *et al.* The amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations in neuronal signaling that lead to tau phosphorylation and aggregation. *Sci Signal* 2017;**10**.
- Amiry-moghaddam M, Ottersen OP. The Molecular Basis of Water Transport in the Brain. *Nat Rev Neurosci* 2003;**4**:991–1001.
- Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 2013;**36**:375–99.
- Angulo C, Kozlov S, Charpak S *et al.* Glutamate Released from Glial Cells Synchronizes Neuronal Activity in the Hippocampus. *J Neurosci* 2004;**24**:6920–7.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG *et al.* Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 2014;**81**.
- Araque A, Li N, Doyle RT *et al.* SNARE Protein-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *J Neurosci* 2000;**20**:666–73.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP *et al.* Tripartite synapses : glia , the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999;**22**.

Références

- Arbel-ornath M, Hudry E, Boivin JR *et al.* Soluble oligomeric amyloid- β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain. *Mol Neurodegener* 2017;1–14.
- Arizono M, Inavalli VVGK, Panatier A *et al.* Structural basis of astrocytic Ca^{2+} signals at tripartite synapses. *Nat Commun* 2020;11:1–15.
- Arranz AM, De Strooper B. The role of astroglia in Alzheimer’s disease : pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol* 2019;18:406–14.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 2010;468, DOI: 10.1038/nature09613.
- Attwell D, Laughlin SB. An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1133–45.
- Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM *et al.* Diabetes and Alzheimer’s disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;64:272–87.
- Bai F, Zhang Z, Watson DR *et al.* Abnormal Functional Connectivity of Hippocampus in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *BPS* 2009;65:951–8.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate / GABA-glutamine cycle : aspects of transport , neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 2006:641–53.
- Bakker A, Krauss GL, Albert MS *et al.* Report Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuron* 2012;74:467–74.
- Baldwin KT, Eroglu C. Astrocytes “Coordinate” Synapse Maturation and Plasticity. *Neuron* 2018;100:1010–2.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A *et al.* Alzheimer’s disease. *Lancet* 2011;377:1019–31.
- Barnes CA. Memory Deficits Associated With Senescence : A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979;93:74–104.
- von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-houzel S. The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain : A Review of 150 Years of Cell Counting. *J Comp Neurol* 2016;3895:3865–95.
- Bastin C, Bahri MA, Meyer F *et al.* In vivo imaging of synaptic loss in Alzheimer’s disease

- with [18F] UCB-H positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS *et al.* Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2012;**367**:795–804.
- Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci* 2016;**19**:182–9.
- Bélangier M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain Energy Metabolism : Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab* 2011.
- Bellesi M, Vivo L De, Tononi G *et al.* Effects of sleep and wake on astrocytes : clues from molecular and ultrastructural studies. *BMC Biol* 2015:1–17.
- Benarroch EE. NMDA receptors : Recent insights and clinical correlations. *Neurology* 2011;**76**:1750–7.
- Benfenati V, Caprini M, Dovizio M *et al.* An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2011;**108**:2563–8.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease : an emperor in need of clothes. *Nat Publ Gr* 2012;**15**:349–57.
- Bergersen L, Morland C, Ormel L *et al.* Immunogold Detection of L-glutamate and D-serine in Small Synaptic-Like Microvesicles in Adult Hippocampal Astrocytes. 2012:1690–7.
- Bernardinelli Y, Randall J, Janett E *et al.* Activity-Dependent Structural Plasticity of Perisynaptic Astrocytic Domains Promotes Excitatory Synapse Stability. *Curr Biol* 2014;**24**:1679–88.
- Bialas AR, Stevens B. TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci* 2013;**16**.
- Biétry FA, Pfeil AM, Reich O *et al.* Benzodiazepine Use and Risk of Developing Alzheimer's Disease: A Case-Control Study Based on Swiss Claims Data. *CNS Drugs* 2017;**31**:245–51.
- Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N *et al.* Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 2017;**356**, DOI: 10.1126/science.aai8185.
- Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database Syst*

Références

- Rev 2006.
- Bittner T, Burgold S, Dorostkar MM *et al.* Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol* 2012;**124**:797–807.
- Blanco-suarez E, Liu T, Kopelevich A *et al.* Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors. *Neuron* 2018;**100**:1116-1132.e13.
- Bolós M, Perea JR, Avila J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol Concepts* 2017;**8**:37–43.
- Brayton C. Spontaneous Diseases in Commonly Used Mouse Strains / Stocks. *New York, Elsevier (Academic Press)* 2013.
- Brown AM. Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 2004:537–52.
- Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H *et al.* Cerebrospinal fluid levels of β -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry* 2012;**69**:98–106.
- Burda JE, Sofroniew M V. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron* 2014;**81**:229–48.
- Busche MA, Chen X, Henning HA *et al.* Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ *et al.* Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *J Neurosci* 2002;**22**:183–92.
- Butterfield D, Hensley K, Subramaniam R *et al.* Oxidatively Induced Structural Alteration of Glutamine Synthetase Assessed by Analysis of Spin Label Incorporation Kinetics : Relevance to Alzheimer's Disease. *J Neurochem* 1997;**68**:2451–7.
- Cai Z, Schools GP, Kimelberg H. Metabotropic Glutamate Receptors in Acutely Isolated Hippocampal Astrocytes : Developmental Changes of mGluR5 mRNA and Functional Expression. *Glia* 2000;**80**:70–80.
- Caroni P. Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 1997;**71**:3–9.

- Castegna A, Aksenov M, Aksenova M *et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in alzheimer's disease brain. part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**:562–71.
- Castellano JM, Kim J, Stewart FR *et al.* Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance. *Sci Transl Med* 2011;**3**.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N *et al.* Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 2011;**14**:1276–84.
- Castro P, Zaman S, Holland A. Alzheimer's disease in people with Down's syndrome: the prospects for and the challenges of developing preventative treatments. *J Neurol* 2017;**264**:804–13.
- Ceyzériat K, Haim L Ben, Denizot A *et al.* Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2018;**1**:1–23.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER *et al.* Intercellular Signaling in Glial Cells : Calcium Waves and Oscillations in Response to Mechanical Stimulation and Glutamate. *Neuron* 1991;**6**:983–92.
- Choi DW. Excitotoxic Cell Death. *J Neurobiol* 1992;**23**:1261–76.
- Choi W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. 1985;**7**:369–79.
- Choquet D, Triller A. The Dynamic Synapse. *Neuron* 2013;**80**:691–703.
- Chou RC, Kane M, Ghimire S *et al.* Treatment for Rheumatoid Arthritis and Risk of Alzheimer's Disease : A Nested Case-Control Analysis. *CNS Drugs* 2016.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CCA *et al.* Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* 2005;**120**:421–33.
- Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K *et al.* Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 1999;**5**:1–5.
- Chung W, Clarke LE, Wang GX *et al.* Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 2013;**504**.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB *et al.* Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid-

Références

- β Levels In Vivo. *Neuron* 2005;**48**:913–22.
- Citri A, Malenka RC. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008:18–41.
- Citron M, Ohersdorf T, Haass C *et al.* Mutation of the b-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases b -protein production. *Nature* 1992;**360**.
- Clements J, Lester R, Tong G *et al.* The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft. *Science* 1992;**258**.
- Colombo JA. Interlaminar Astroglial Processes in the Cerebral Cortex of Adult Monkeys But Not of Adult Rats. *Acta Anat* 1996:57–62.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM. Ca^{2+} waves in astrocytes. *Cell Calcium* 1991;**12**:185–204.
- Dalglish AG. Immunotherapy of AIDS. *Curr Opin Biotechnol* 1992;**3**:650–5.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;**65**:1–105.
- Daneman R, Prat A. The Blood – Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015.
- Davis DA, Mondo K, Stern E *et al.* Cyanobacterial neurotoxin BMAA and brain pathology in stranded dolphins. *PLoS One* 2019:1–18.
- Decourt B, Lahiri DK, Sabbagh MN *et al.* Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2017;**14**:412–25.
- Deitmer JW, Rose CR. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 2009;**63**:113–29.
- Delekate A, Füchtmeier M, Schumacher T *et al.* Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 2014;**5**:5422.
- Dickerson BC, Salat DH, Greve DN *et al.* Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology* 2005;**66**:404–12.
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA *et al.* Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 1991;**13**:179–89.
- Diniz LP, Tortelli V, Matias XI *et al.* Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A β Oligomers in Alzheimer's Disease Model. 2017;**37**:6797–809.

- Le Douce J, Maugard M, Veran J *et al.* Impairment of Glycolysis-Derived L -Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab* 2020;**31**:503–17.
- Edler MK, Sherwood CC, Meindl RS *et al.* Neurobiology of Aging Aged chimpanzees exhibit pathologic hallmarks of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2017;**59**:107–20.
- Eid SR, Crown ED, Moore EL *et al.* HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 2008;**10**:1–10.
- Ekert JO, Gould RL, Reynolds G *et al.* TNF alpha inhibitors in Alzheimer's disease : A systematic review. *Int J Geriatr Psychiatry* 2018;**33**:688–94.
- Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 2010;**468**.
- Esquerda-canals G, Montoliu-gaya L, Jofre G. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2017;**57**:1171–83.
- FAG de Bruijn R, Ikram MA. Cardiovascular Risk Factors and Alzheimer's Disease. *BMC Med* 2014;**12**.
- Fagg G, Foster A. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 1983;**9**:701–19.
- Faivre E, Coelho JE, Zornbach K *et al.* Beneficial Effect of a Selective Adenosine A2A Receptor Antagonist in the APP^{swe} / PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 2018;**11**:1–13.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S *et al.* Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron* 2004;**43**:729–43.
- Ferreira IL, Ferreira E, Schmidt J *et al.* A β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiol Aging* 2015;**36**:680–92.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B *et al.* Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2005;**2**:3–18.
- Ferrini S, Melioli G, Moretta T. Immunotherapy and immunity to cancer : cellular mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1990;**2**:683–8.

Références

- Fiacco TA, Mccarthy KD. Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *J Neurosci* 2018;**38**:3–13.
- Fratiglioni L, Paillard-borg S, Winblad B. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol* 2004;**4**:343–53.
- Frere S, Slutsky I. Alzheimer's Disease : From Firing Instability to Homeostasis Network Collapse. *Neuron* 2017;**97**:32–58.
- Frost GR, Li Y. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol* 2017:1–14.
- Games D, Adams D, Alessandrini R *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 1995;**373**:523–7.
- Gao C, Liu Y, Li L. New animal models of Alzheimer's disease that display insulin desensitization in the brain. *Rev Neurosci* 2013;**24**:607–15.
- Garcia-Marin V, Garcia-Lopez P, Freire M. Cajal's contributions to glia research. *Trends Cell Biol* 2007;**30**, DOI: 10.1016/j.tins.2007.06.008.
- Gengler S, Hamilton A, Ho C. 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* 2010;**5**:1–10.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L *et al.* Astroglial networks : a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010;**11**:87–99.
- Gibbs ME, Anderson DG, Hertz L. Inhibition of Glycogenolysis in Astrocytes Interrupts Memory Consolidation in Young Chickens. *Glia* 2006;**54**:214–22.
- Gielen M. Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate. *Medecine/Sciences* 2010;**26**:65–72.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;**120**:885–90.
- Gómez-gonzalo M, Zehnder T, Reque LM *et al.* Insights into the release mechanism of astrocytic glutamate evoking in neurons NMDA receptor-mediated slow depolarizing inward currents. *Glia* 2018:1–12.

- Götz J, Chen F, van Dorpe J *et al.* Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β 42 Fibrils. 2001;**293**:1491–6.
- Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E *et al.* Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1998;**1**:223–8.
- Graybeal JJ, Bozzelli PL, Graybeal LL *et al.* Human ApoE ϵ 4 Alters Circadian Rhythm Activity , IL-1 α , and GFAP in CRND8 Mice. 2015;**43**:823–34.
- Grundke-iqbal I, Iqbal K, Tung Y *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein X (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**:4913–7.
- Guillemaud O, Ceyzériat K, Saint-georges T *et al.* Complex roles for reactive astrocytes in the triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2020;**90**:135–46.
- Gulisano XW, Melone M, Ripoli C *et al.* Neuromodulatory Action of Picomolar Extracellular A β 42 Oligomers on Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Synaptic Function and Memory. 2019;**39**:5986–6000.
- Haberman RP, Branch A, Gallagher M. Targeting Neural Hyperactivity as a Treatment to Stem Progression of Late-Onset Alzheimer ' s Disease. *Neurotherapeutics* 2017;**14**:662–76.
- Haj-yasein NN, Jensen V, Østby I *et al.* Aquaporin-4 Regulates Extracellular Space Volume Dynamics During High-Frequency Synaptic Stimulation : A Gene Deletion Study in Mouse Hippocampus. *Glia* 2012;**60**:867–74.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H *et al.* Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *J Neurosci* 2007;**27**:6473–7.
- Hamby ME, Sofroniew M V. Reactive Astrocytes As Therapeutic Targets for CNS Disorders. *Neurotherapeutics* 2010;**7**:494–506.
- Han J, Besser LM, Xiong C *et al.* Cholinesterase Inhibitors May Not Benefit Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer Disease Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2019;**33**:87–94.
- Han K-S, Woo J, Park H *et al.* Channel-mediated astrocytic glutamate release via Bestrophin-1 targets synaptic NMDARs. *Mol Brain* 2013a;**6**:4.
- Han X, Chen M, Wang F *et al.* Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells

Références

- Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice. *Cell Stem Cell* 2013b;**12**:342–53.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002;**5**
- Hardy JA, GA. H. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*) 1992;**256**:184–5.
- Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* 1954;**3**.
- Hefendehl JK, Ledue J, Mahler J *et al.* Mapping synaptic glutamate transporter dysfunction in vivo to regions surrounding Ab plaques by iGluSnFR two-photon imaging. *Nat Commun* 2016.
- Henneberger C, Bard L, Panatier A *et al.* LTP induction boosts glutamate spillover by driving withdrawal of astroglia. *bioRxiv* 2020.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR *et al.* Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010;**463**:232–6.
- Hertle DN, Yeckel MF. Distribution of inositol-1,4,5-triphosphate receptor isoforms during maturation of the rat hippocampus. *Neuroscience* 2007;**150**:625–38.
- Heuser K, Nome CG, Pettersen KH *et al.* Ca²⁺ Signals in Astrocytes Facilitate Spread of Epileptiform Activity. *Cereb Cortex* 2018;**28**:4036–48.
- Hock C, Drasch G, Golombowski S *et al.* Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998;**105**:59–68.
- Hoe J, Hancock G, Livingston G *et al.* Quality of life of people with dementia in residential care homes. *Br J psychiatry* 2006;**188**:460–4.
- Höfer T, Venance L, Giaume C. Control and Plasticity of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes : A Modeling Approach Thomas Ho. *J Neurosci* 2002;**22**:4850–9.
- Hoogland TM, Kuhn B, Göbel W *et al.* Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. *Proc Natl Acad Sci* 2009;**106**:3496–501.
- Hoshi A, Tsunoda A, Yamamoto A *et al.* Altered expression of glutamate transporter-1 and water channel protein aquaporin-4 in human temporal cortex with Alzheimer ' s disease. 2018;**44**:628–38.

- Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K *et al.* Characteristics of Aquaporin Expression Surrounding Senile Plaques and Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;**71**:750–9.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer ' s disease. *Neurochem Int* 2004;**45**:583–95.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y *et al.* A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med* 2012;**4**.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N *et al.* Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 1994;**13**:45–53.
- Jack CJ, Petersen R, Xu Y *et al.* Rates of Hippocampal Atrophy Correlate with Change in Clinical Status in Aging and AD. 2009;**55**:484–9.
- Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ *et al.* GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer ' s disease. *Nat Med* 2014;**20**.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 2012;**488**.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H *et al.* APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003;**37**:925–37.
- Kanemaru K, Sekiya H, Xu M *et al.* In Vivo Visualization of Subtle , Transient , and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator. *Cell Rep* 2014;**8**:311–8.
- Kerchner GA, Nicoll RA. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for ltp. *Nat Rev Neurosci* 2008;**9**:813–25.
- Kishi T, Matsunaga S, Oya K *et al.* Memantine for Alzheimer's Disease : An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimer's Dis* 2017;**60**:401–25.
- Klausberger T, Somogyi P. Neuronal Diversity and Temporal Dynamics : The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science* 2008;**321**:53–8.
- Kobayashi E, Nakan M, Kubota K *et al.* Activated forms of astrocytes with higher GLT-1 expression are associated with cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in

Références

- human brain. *Sci Rep* 2018;2–13.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**:4044–8.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H *et al.* Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP / PS1 mice. *FASEB J* 2013;**27**:187–98.
- Kucheryavykh Y V, Kucheryavykh LY, Nichols CG *et al.* Downregulation of Kir4 . 1 Inward Rectifying Potassium Channel Subunits by RNAi Impairs Potassium Transfer and Glutamate Uptake by Cultured Cortical Astrocytes. *Glia* 2007;**55**:274–81.
- Kuchibhotla K V, Lattarulo CR, Hyman BT *et al.* Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. *Science* 2009;**323**:1211–6.
- Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT *et al.* Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci* 2011;**108**.
- Kuga N, Sasaki T, Takahara Y *et al.* Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo. *J Neurosci* 2011;**31**:2607–14.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007;**8**:499–509.
- Lam AD, Deck G, Goldman A *et al.* Silent hippocampal seizures and spikes identified by foramen ovale electrodes in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2017;**23**:678–80.
- Landsberg GM, Nichol J. Cognitive Dysfunction Syndrome A Disease of Canine and Feline Brain Aging. *Vet Clin Small Anim* 2012;**42**:749–68.
- Lau CG, Takeuchi K, Rodenas-ruano A *et al.* Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans* 2009;**37**:1369–74.
- Lee H, Xie L, Yu M *et al.* The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *J Neurosci* 2015;**35**:11034–44.
- Lee K-I, Lee H-T, Lin H-C *et al.* Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2016;**13**:92.
- Lee L, Kosuri P, Arancio O. Picomolar Amyloid- β Peptides Enhance Spontaneous Astrocyte

- Calcium Transients. *J Alzheimer's Dis* 2014;**38**:49–62.
- Lee S, Yoon B, Berglund K *et al.* Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science* 2010;**330**:790–7.
- Lehre KP, Danbolt NC. The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses : Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain. *J Neurosci* 1998;**18**:8751–7.
- Leissring MA, Murphy MP, Mead TR *et al.* A physiologic signaling role for the β - secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci* 2002;**99**.
- Léveillé F, El Gaamouch F, Gouix E *et al.* Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors ABSTRACT. *FASEB J* 2008;**22**:4258–71.
- Li J, Mahajan A, Tsai M. Ankyrin Repeat : A Unique Motif Mediating Protein - Protein Interactions. *Biochemistry* 2006:15168–78.
- Li S, Hong S, Shepardson NE *et al.* Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* 2009;**62**:788–801.
- Li S, Selkoe DJ. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble A β oligomers from Alzheimer's brain. *J Neurochem* 2020:1–15.
- Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential Shane. *Immunity* 2017;**46**:957–67.
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017;**541**:481–7.
- Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease : An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 2019;**179**:312–39.
- Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. 1957;**58**:193–201.
- MacDermott A, Mayer M, Westbrook G *et al.* NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. 1986;**321**:519–22.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ *et al.* Noxious compounds activate TRPA1 ion channels

Références

- through covalent modification of cysteines. *Nature* 2007;**445**:541–5.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL *et al.* Energy on Demand. *Science* 1999;**283**.
- Mahley RW. Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol* 2016;**36**:1305–15.
- Mahoney-Sanchez L, Belaidi AA, Bush AI *et al.* The Complex Role of Apolipoprotein E in Alzheimer’s Disease: an Overview and Update. *J Mol Neurosci* 2016;**60**:325–35.
- Mann EO, Paulsen O. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Cell Biol* 2007;**30**.
- Mannari T, Morita S, Furube E *et al.* Astrocytic TRPV1 Ion Channels Detect Blood-Borne Signals in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brains. *Glia* 2013.
- Marcaggi P, Attwell D. Role of Glial Amino Acid Transporters in Synaptic Transmission and Brain. *Glia* 2004;**225**:217–25.
- Marchetti M, Marie H. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer’s disease: What have we learned so far from transgenic models? *Rev Neurosci* 2011;**22**:373–402.
- Martín R, Bajo-Grañeras R, Moratalla R *et al.* Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 2015;**349**:730–5.
- Masliyah E, Alford M, Deteresa R *et al.* Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer’s disease. 1996;**40**:759–66.
- Mathiesen C, Brazhe A, Thomsen K *et al.* Spontaneous calcium waves in Bergman glia increase with age and hypoxia and may reduce tissue oxygen. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;**33**:161–9.
- Matos M, Bosson A, Riebe I *et al.* Astrocytes detect and upregulate transmission at inhibitory synapses of somatostatin interneurons onto pyramidal cells. *Nat Commun* 2018;**9**.
- Matsugami TR, Tanemura K, Mieda M *et al.* Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:1–5.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S *et al.* CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science* 2001;**294**:1354–8.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer’s disease. *Lancet* 1997;**349**:1906–9.

- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW *et al.* Soluble pool of AB amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;**46**:860–6.
- McNamara CR, Mandel-brehm J, Bautista DM *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:13525–30.
- McShane R, Westby M, Roberts E *et al.* Memantine for dementia (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2019.
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998;**394**:192–5.
- Mihara S, Shibamoto T. The role of flavor and fragrance chemicals in TRPA1 (transient receptor potential cation channel , member A1) activity associated with allergies. *Allergy, Asthma Clin Immunol* 2015;**11**:1–12.
- Miller FD, Gauthier AS. Timing Is Everything : Making Neurons versus Glia in the Developing Cortex. *Neuron* 2007;**54**:357–69.
- Miller SL, Fenstermacher E, Bates J *et al.* Hippocampal activation in adults with mild cognitive impairment predicts subsequent cognitive decline. 2008:630–5.
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P *et al.* Cellular and subcellular localization of Na⁺ – Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 2007;**41**:221–34.
- Mishizen-eberz AJ, Rissman RA, Carter TL *et al.* Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1 / 2A / 2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer ' s disease pathology. *Neurobiol Dis* 2004;**15**:80–92.
- Mookherjee P, Green PS, Watson GS *et al.* GLT-1 Loss Accelerates Cognitive Deficit Onset in an Alzheimer ' s Disease Animal Model. *J Alzheimer's Dis* 2011;**26**:447–55.
- Munger EL, Edler MK, Hopkins WD *et al.* Astrocytic changes with aging and Alzheimer's disease-type pathology in chimpanzees Running. *J Comp Neurol* 2018.
- Navarrete M, Perea G, Sevilla DF De *et al.* Astrocytes Mediate In Vivo Cholinergic-Induced Synaptic Plasticity. *Pos Biol* 2012;**10**.
- Nedergaard M. Garbage Truck of the Brain. *Science* 2013;**340**:1529–31.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. Hippocampal Astrocytes In Situ Exhibit Calcium

Références

- Oscillations That Occur Independent of Neuronal Activity. *J Neurophysiol* 2002;**87**:528–37.
- Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1 : from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2012;**464**:425–58.
- Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors : Physiology , Pharmacology , and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;**50**:295–322.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine Structural Localization of Glutamine Synthetase in Astrocytes of Rat Brain. *Brain Res* 1979;**161**:303–10.
- Nwaobi SE, Cuddapah VA, Patterson KC *et al.* The role of glial specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathol* 2016;**132**:1–21.
- O’Brien JL, O’Keefe KM, Laviolette PS *et al.* Longitudinal fMRI in elderly reveals loss of hippocampal activation with clinical decline. 2010.
- O’Leary TP, Mantolino HM, Stover KR *et al.* Age-related deterioration of motor function in male and female 5xFAD mice from 3 to 16 months of age. *Genes Brain Behav* 2018.
- Oakley H, Cole SL, Logan S *et al.* Intraneuronal β -Amyloid Aggregates , Neurodegeneration , and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer ’ s Disease Mutations : Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 2006;**26**:10129–40.
- Oberheim NA, Takano T, Han X *et al.* Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J Neurosci* 2009;**29**:3276–87.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S *et al.* Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 2006;**29**.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD *et al.* Triple-Transgenic Model of Alzheimer ’ s Disease with Plaques and Tangles : Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. 2003;**39**:409–21.
- Oh S, Lee CJ. Distribution and Function of the Bestrophin-1 (Best1) Channel in the Brain. *Exp Neurobiol* 2017;**26**:113–21.
- Oh S, Lee JM, Kim H *et al.* Ultrasonic Neuromodulation via Astrocytic TRPA1. *Curr Biol* 2019;**29**:3386-3401.e8.
- Oliet SHR, Mothet J-P. Regulation of N-methyl-D-aspartate Receptors by Astrocytic D-serine. *Neuroscience* 2009;**158**:275–83.

- Olney JW. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science* 1969;**164**:719–21.
- Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971;**30**:75–90.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED *et al.* Article Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer’s Disease. *Neuron* 2007;**55**:697–711.
- Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2016;**17**.
- Pan H, Chou Y, Sun SH. P2X7R-Mediated Ca²⁺-Independent D-Serine Release via Pannexin-1 of the P2X 7 R-Pannexin-1 Complex in Astrocytes. *Glia* 2015:877–93.
- Panatier a., Robitaille R. Astrocytic mGluR5s and the tripartite synapse. *Neuroscience* 2015:6–11.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet J *et al.* Glia-Derived D -Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* 2006;**125**:775–84.
- Panatier A, Vallée J, Haber M *et al.* Astrocytes Are Endogenous Regulators of Basal Transmission at Central Synapses. *Cell* 2011;**146**:785–98.
- Papouin T, Dunphy J, Tolman M *et al.* Astrocytic control of synaptic function. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci* 2017a.
- Papouin T, Dunphy JM, Tolman M *et al.* Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness. *Neuron* 2017b;**94**:840-854.e7.
- Papouin T, Henneberger C, Rusakov DA *et al.* Astroglial versus Neuronal D-Serine : Fact Checking. *Trends Neurosci* 2017c;**40**:517–20.
- Parekh AB, Putney JW. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 2005;**85**:757–810.
- Park H, Han K-S, Oh S-J *et al.* High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte. *Mol Brain* 2013;**6**:54.
- Park H, Oh S, Han K *et al.* Bestrophin-1 Encodes for the Ca²⁺-Activated Anion Channel in Hippocampal Astrocytes. *J Neurosci* 2009;**29**:13063–73.

Références

- Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca^{2+} oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 2001;**4**.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C *et al.* Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* 2005:113–7.
- Paulsen CE, Armache J, Gao Y *et al.* Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 2015;**520**.
- Petravicz J, Fiacco TA, McCarthy KD. Loss of IP₃ Receptor-Dependent Ca^{2+} Increases in Hippocampal Astrocytes Does Not Affect Baseline CA1 Pyramidal Neuron Synaptic Activity. *J Neurosci* 2008;**28**:4967–73.
- Pfrieger FW, Barres BA. Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. 1997;**277**.
- Pirttimaki TM, Codadu NK, Awni A *et al.* $\alpha 7$ Nicotinic Receptor-Mediated Astrocytic Gliotransmitter Release: A β Effects in a Preclinical Alzheimer's Mouse Model. *PLoS One* 2013;**8**:1–12.
- Pirttimaki TM, Hall SD, Parri HR. Sustained Neuronal Activity Generated by Glial Plasticity. *J Neurosci* 2011;**31**:7637–47.
- Platel JC, Dupuis A, Boisseau S *et al.* Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 2007;**25**:920–8.
- Plattner H, Verkhratsky A. The ancient roots of calcium signalling evolutionary tree. *Cell Calcium* 2015;**57**:123–32.
- Porrero C, Rubio-Garrido P, Avendano C *et al.* Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res* 2010;**1345**:59–72.
- Price JL, Ko AI, Wade MJ *et al.* Neuron Number in the Entorhinal Cortex and CA1 in Preclinical Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2001;**58**:1395–402.
- Puzzo D, Arancio O. Amyloid- β Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimer's Dis* 2013;**33**.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E *et al.* Picomolar Amyloid- β Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *J Neurosci* 2008;**28**:14537–45.
- Puzzo D, Privitera L, Palmeri A. Hormetic effect of amyloid-beta peptide in synaptic plasticity and memory. *NBA* 2012;**33**:1484.e15-1484.e24.

- Radde R, Bolmont T, Kaeser S a *et al.* Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 2006;**7**:940–6.
- Ransom CB, Ransom BR, Sontheimer H. Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve : the role of glial and axonal Na⁺ pumps. *J Physiol* 2000;**522**:427–42.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI *et al.* Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2002;**99**:6364–9.
- Reichenbach A, Derouiche A, Kirchhoff F. Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 2010;**63**:11–25.
- Reichenbach N, Delekate A, Breithausen B *et al.* P2Y1 receptor blockade normalizes network dysfunction and cognition in an Alzheimer ' s disease model. *J Exp Med* 2018;**215**:1649–63.
- Reiss AB, Arain HA, Stecker MM *et al.* Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. 2018.
- Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014;**88**:640–51.
- Ries M, Sastre M. Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Front Aging Neurosci* 2016;**8**:1–9.
- Rodriguez-arellano J, Parpura V, Zorec R *et al.* Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2016;**323**:170–82.
- Rodríguez-moreno A, Sihra TS. Metabotropic Actions of Kainate Receptors in the Control of Glutamate Release in the Hippocampus. *Adv Exp Med Biol* 2011.
- Rodriguez-vieitez E, Saint-aubert L, Carter SF *et al.* Diverging longitudinal changes in astrocytosis and amyloid PET in autosomal dominant Alzheimer's disease. *Brain a J Neurol* 2016;**139**:922–36.
- Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-gadda H. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease : an 8-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 2000;**152**:7–9.
- Rose CR, Felix L, Zeug A *et al.* Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci* 2018;**10**:1–20.
- Rothman DL, Feyter HM De, Graaf RA De *et al.* 13C MRS studies of neuroenergetics and

Références

- neurotransmitter cycling in humans. *NMR Biomed* 2011;**24**:943–57.
- Rungta RL, Bernier L, Dissing-olesen L *et al.* Ca²⁺ Transients in Astrocyte Fine Processes Occur Via Ca²⁺ Influx in the Adult Mouse Hippocampus. *Glia* 2016.
- Rupp NJ, Wegenast-braun BM, Radde R *et al.* Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local , but not global neuron loss in APPS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2011;**32**:2324.e1-2324.e6.
- Sakmann B, Neher E. Patch Clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 1984;**46**:455–72.
- Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Membr Protein Complexes Struct Funct* 2018:141–65.
- Sanz-blasco S, Piña-crespo JC, Zhang X *et al.* Levetiracetam inhibits oligomeric A β -induced glutamate release from human astrocytes. 2016:705–9.
- Sarafian TA, Montes C, Imura T *et al.* Disruption of Astrocyte STAT3 Signaling Decreases Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress In Vitro. *PLoS One* 2010;**5**:1–11.
- Sarkar S. Neurofibrillary tangles mediated human neuronal tauopathies: insights from fly models. *J Genet* 2018;**97**:783–93.
- Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S *et al.* APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* 2017;**36**:2473–87.
- Sason H, Billard JM, Smith GP *et al.* Asc-1 Transporter Regulation of Synaptic Activity via the Tonic Release of \square -Serine in the Forebrain. *Cereb Cortex* 2017:1573–87.
- Sattler R, Xiong Z, Lu W *et al.* Distinct Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Excitotoxicity. *J Neurosci* 2000;**20**:22–33.
- Savtchouk I, Volterra A. Gliotransmission : Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 2018;**38**:14–25.
- Schallier A, Smolders I, Dam D Van *et al.* Region- and Age-Specific Changes in Glutamate Transport in the A β PP23 Mouse Model for Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2011;**24**:287–300.
- Scheff SW, Price DA, Dekosky ST. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. 2007.

- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA *et al.* Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2006;**27**:1372–84.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W *et al.* Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;**400**:173–7.
- Schipper HM. Apolipoprotein E: Implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. *Neurobiol Aging* 2011;**32**:778–90.
- Schmid LC, Mittag M, Poll S *et al.* Dysfunction of Somatostatin-Positive Interneurons Associated with Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* 2016;**92**:114–25.
- Sederberg PB, Schulze-bonhage A, Madsen JR *et al.* Hippocampal and Neocortical Gamma Oscillations Predict Memory Formation in Humans. *Cereb Cortex* 2007;**17**.
- Selkoe DJ. The Molecular of Pathology Disease. *Neuron* 1991;**6**:487–98.
- Selkoe DJ. Alzheimer ' s Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011.
- Selkoe DJ. Alzheimer disease and aducanumab : adjusting our approach. *Nat Rev Neurol* 2019.
- Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer ' s disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016;**8**:595–608.
- Semar S, Klotz M, Letiembre M *et al.* Changes of the Enteric Nervous System in Amyloid- β Protein Precursor Transgenic Mice Correlate with Disease Progression. *J Alzheimer's Dis* 2013;**36**:7–20.
- Serneels L, Biervliet J Van, Craessaerts K *et al.* gamma-Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease. *Science* 2009;**324**:639–43.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille J *et al.* GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *J Neurosci* 2006;**26**:5370–82.
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T *et al.* The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer ' s disease. *Nature* 2016;**537**, DOI: 10.1038/nature19323.
- Sgourakis NG, Yan Y, Mccallum SA *et al.* The Alzheimer's Peptides A β 40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water: A Combined MD / NMR Study. *J Mol Biol* 2007;**368**:1448–57.

Références

- Shankar GM, Li S, Mehta TH *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;**14**:837–42.
- Shen L, Ji H. Associations Between Gut Microbiota and Alzheimer's Disease: Current Evidences and Future Therapeutic and Diagnostic Perspectives. *J Alzheimer's Dis* 2019;**68**:25–31.
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew M V *et al.* Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 2008;**28**:6659–63.
- Shigetomi E, Jackson-Weaver O, Huckstepp RT *et al.* TRPA1 Channels Are Regulators of Astrocyte Basal Calcium Levels and Long-Term Potentiation via Constitutive D-Serine Release. *J Neurosci* 2013;**33**:10143–53.
- Shigetomi E, Patel S, Khakh BS. Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends Cell Biol* 2016;**xx**:1–13.
- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY *et al.* TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 2012;**15**:70–80.
- Shih P, Savtchenko LP, Kamasawa N *et al.* Retrograde Synaptic Signaling Mediated by K⁺ Efflux through Postsynaptic NMDA Receptors. *Cell Rep* 2013;**5**:941–51.
- Shrivastava AN, Kowalewski JM, Renner M *et al.* β -Amyloid and ATP-Induced Diffusional Trapping of Astrocyte and Neuronal Metabotropic Glutamate Type-5 Receptors. *Glia* 2013.
- Singh SK, Stogsdill JA, Pulimood NS *et al.* Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Article Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 a and NL1 via Hevin. *Cell* 2016;**164**:183–96.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG *et al.* Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-b. *Nat Neurosci* 2005;**8**:1051–8.
- Sofroniew M V. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neurosci* 2005:400–7.
- Sofroniew M V. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;**7**.
- Soria FN, Pérez-samartín A, Martín A *et al.* Extrasynaptic glutamate release through cystine / glutamate antiporter contributes to ischemic damage Find the latest version : Extrasynaptic

- glutamate release through cystine / glutamate antiporter contributes to ischemic damage. *J Clin Invest* 2014;**124**:3645–55.
- Sperling R. The potential of functional MRI as a biomarker in early Alzheimer ' s disease. *NBA* 2011;**32**:S37–43.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M *et al.* Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci* 1998;**95**:7737–41.
- Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S *et al.* Ca²⁺ signaling in astrocytes from Ip3r2^{-/-} mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci* 2015;**18**.
- Startek JB, Boonen B, Lo A *et al.* Mouse TRPA1 function and membrane localization are modulated by direct interactions with cholesterol. *Elife* 2019:1–24.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE *et al.* The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell* 2007;**131**:1164–78.
- Stickgold R. Sleep-dependent memory consolidation. *Nature* 2005;**437**.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ *et al.* ANKTM1 , a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons , Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 2003;**112**:819–29.
- De Strooper B. Essay Lessons from a Failed g -Secretase Alzheimer Trial. *Cell* 2014;**159**:721–6.
- De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 2016;**164**:603–15.
- Sultan S, Li L, Moss J *et al.* Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes Article Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. 2015:957–72.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O *et al.* Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell* 2011;**144**:810–23.
- Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;**50**:3–20.
- Takano T, Han X, Deane R *et al.* Two-Photon Imaging of Astrocytic Ca²⁺ Signaling and the Microvasculature in Experimental Mice Models of Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2007;**50**:40–50.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X *et al.* A β induces astrocytic glutamate release,

Références

- extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci* 2013;**110**:13690–1.
- Tanaka M, Shih P, Gomi H *et al.* Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Mol Brain* 2013;**6**:1–13.
- Teich AF, Patel M, Arancio O. A Reliable Way to Detect Endogenous Murine β -Amyloid. *PLoS One* 2013;**8**.
- Thrane AS, Thrane VR, Zeppenfeld D *et al.* General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:18974–9.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H *et al.* A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 2008;**63**:377–87.
- Tomiyama T, Shimada H. APP Osaka Mutation in Familial Alzheimer's Disease — Its Discovery , Phenotypes , and Mechanism of Recessive Inheritance. *Int J Mol Sci* 2020;**21**.
- Trevisan G, Benemei \tilde{A} S, Materazzi \tilde{A} S *et al.* TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes / macrophages and oxidative stress. *Brain* 2016;**139**:1361–77.
- Tu S, Okamoto S, Lipton SA *et al.* Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2014:1–12.
- Uddin S, Kabir T, Al A *et al.* Pharmacological approaches to mitigate neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2020;**84**:106479.
- Umpierre AD, West PJ, White JA *et al.* Conditional Knock-out of mGluR5 from Astrocytes during Epilepsy Development Impairs High-Frequency Glutamate Uptake. *J Neurosci* 2019;**39**:727–42.
- Varga E, Juhász G, Bozsó Z *et al.* Abeta (1-42) Enhances Neuronal Excitability in the CA1 via NR2B Subunit-Containing NMDA Receptors. *Neural Plast* 2014.
- Ventura R, Harris KM. Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *J Neurosci* 1999;**19**:6897–906.
- Verkhatsky A. Astroglial Calcium Signaling in Aging and Alzheimer ' s Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;**11**.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 2018;**98**:239–389.

- Verkhratsky A, Reyes RC, Parpura V. TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2013.
- Verkhratsky A, Sofroniew M V, Messing A *et al.* Neurological diseases as primary gliopathies : a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* 2012;**4**:131–49.
- Verret L, Mann EO, Hang GB *et al.* Inhibitory Interneuron Deficit Links Altered Network Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Model. *Cell* 2012;**149**:708–21.
- Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I. Astrocyte Ca(2+) signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci* 2014;**15**:327–35.
- Vossel KA, Ranasinghe KG, Beagle AJ *et al.* Incidence and Impact of Subclinical Epileptiform Activity in Alzheimer’s Disease. *Ann Neurol* 2016;**80**:858–70.
- Vossel KA, Tartaglia MC, Nygaard HB *et al.* Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. *Lancet Neurol* 2017;**16**:311–22.
- Wallraff A, Heinemann U, Theis M *et al.* The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *J Neurosci* 2006;**26**:5438–47.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A b Oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* 2007;**101**:1172–84.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid b -protein and beyond : the path forward in Alzheimer’s disease. *Curr Opin Neurobiol* 2020;**61**:116–24.
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ *et al.* The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer’s disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 1999;**158**:328–37.
- Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RCS *et al.* Upregulation of L-Type Ca²⁺ Channels in Reactive Astrocytes after Brain Injury , Hypomyelination , and Ischemia. *J Neurosci* 1998;**18**:2321–34.
- Whishaw IQ, Tomie J-A. Of Mice and Mazes: Similarities Between Mice and Rats on Dry Land but Not Water Mazes. *Physiol Behav* 1996;**60**:1191–7.
- Wilson SR, Gerhold KA, Bifulco-fisher A *et al.* TRPA1 is required for histamine-independent , Mas-related G protein – coupled receptor – mediated itch. *Nat Neurosci* 2011;**14**.
- Witcher MR, Kirov SA, Harris KM. Plasticity of Perisynaptic Astroglia During Synaptogenesis

Références

- in the Mature Rat Hippocampus. *Glia* 2007;**23**:13–23.
- Wolfe MS. γ -Secretase in biology and medicine. *Semin Cell Dev Biol* 2009;**20**:219–24.
- Xu Z, Xiao N, Chen Y *et al.* Deletion of aquaporin-4 in APP / PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits. *Mol Neurodegener* 2015:1–16.
- Ye Z, Wyeth MS, Baltan-tekkok S *et al.* Functional Hemichannels in Astrocytes : A Novel Mechanism of Glutamate Release. *J Neurosci* 2003;**23**:3588–96.
- Yu J-T, Tan L, Hardy J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. *Annu Rev Neurosci* 2014;**37**:79–100.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC *et al.* Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *J Neurosci* 2012;**32**:6391–410.
- Zanotti S, Charles A. Extracellular Calcium Sensing by Glial Cells : Low Extracellular Calcium Induces Intracellular Calcium Release and Intercellular Signaling. *J Neurochem* 1997:594–602.
- Zhang Y, Li P, Feng J *et al.* Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer ' s disease. *Neurol Sci* 2016:1039–47.
- Zott B, Simon MM, Hong W *et al.* A vicious cycle of b amyloid – dependent neuronal hyperactivation. *Science* 2019;**565**:559–65.

ANNEXES

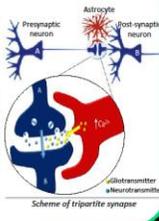
Annexe 1: Poster pour XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2019 (Porto)

#T05-010A : Involvement of astrocytes in synaptotoxicity in early stages of Alzheimer's disease

PAUMIER A., BOSSON A., BOISSEAU S., BUISSON A., ALBRIEUX M

Background

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that affects progressively memory and cognitive functions. AD is characterized by the extracellular deposition of amyloid- β ($A\beta$). More and more evidences prove that **soluble oligomeric forms of $A\beta$ ($A\beta_o$)** are the most toxic forms and are involved in **synaptic dysfunctions** which are thought to be one of the earliest events in AD. **Astrocytes**, the most abundant glial cells in the brain, are active components of synaptic transmission through the formation of **tripartite synapses**. Recent studies suggest that astrocytes could play a major role in synaptic dysfunctions but its involvement in early stages of AD remained largely unknown.



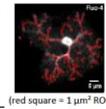
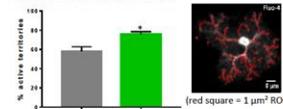
Aims

1. Studying functional alterations of astrocyte activity in early stages of AD
2. Characterizing consequences of these astrocytic alterations on nearby neurons
3. Restoring neuronal function in AD by targeting astrocytes

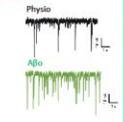
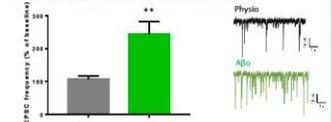
Acute $A\beta_o$ exposition impairs astrocyte and neuronal activity

$A\beta_o$ 1-42 100 nM, 5 min in the extracellular medium

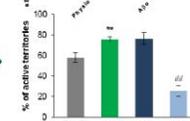
1. Astrocyte calcium activity



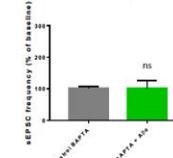
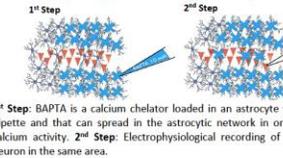
2. Electrophysiological neuronal activity



3. Astrocyte calcium hyperactivity is independent of neuronal activity and dependent on extracellular calcium entry

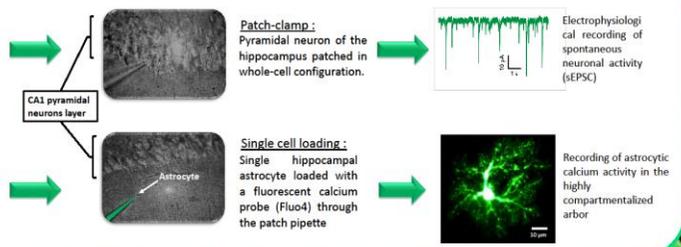
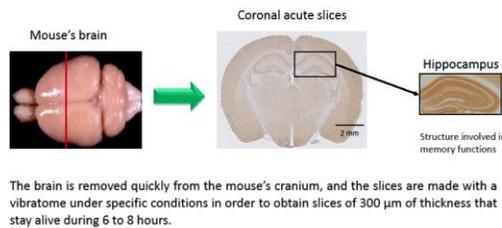


4. Electrophysiological neuronal hyperactivity is dependent on astrocyte calcium activity



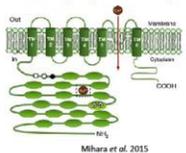
$A\beta_o$ induce an astrocytic calcium hyperactivity that affects nearby neuronal activity

Methods



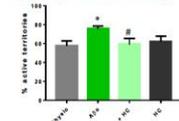
Involvement of TRPA1 calcium channel in $A\beta_o$ impact

Transient receptor potential ankyrin 1

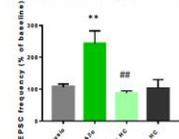


- Transmembrane anionic channel with high Ca^{2+} permeability
- Expressed only in astrocyte in the hippocampus
- Mechanical and chemical stress sensor
- HC 030031 : specific inhibitor (named HC on graphs)

1. Astrocyte calcium activity



2. Electrophysiological neuronal activity



TRPA1 inhibition blocks the effect of $A\beta_o$ on both neuronal and astrocyte activity

Conclusions

Astrocytes contribute to the establishment of early neuronal hyperactivity, potential prelude to synaptotoxicity, through activation of TRPA1 channels.

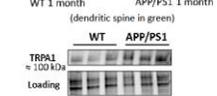
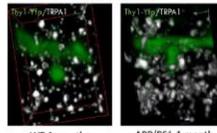
Involvement of astrocytes in early stages of a mouse model of Alzheimer's disease



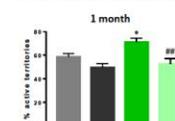
APP/PS1 mouse:

- Overproduction of human form of $A\beta_o$ 1-42 from 2 weeks old.
- Astroglia from 4 months old
- Appearance of "senile plaques" in the hippocampus from 6 months old.
- Cognitive deficits from 8 months old.

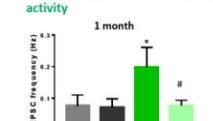
Overexpression of TRPA1 in the hippocampus of 1 month old APP/PS1 mice



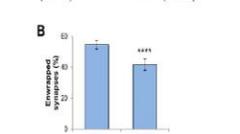
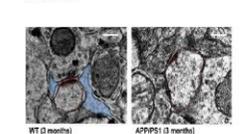
1. Astrocyte calcium activity



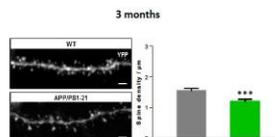
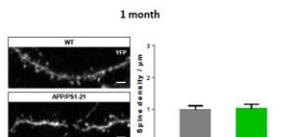
2. Electrophysiological neuronal activity



3. Proportion of tripartite synapses in CA1 area



4. Synaptic density



At early presymptomatic stages (1 month old) APP/PS1 mice display both neuronal and astrocytic hyperactivity that depends on the astrocytic calcium channel TRPA1. Moreover, TRPA1 is overexpressed nearby dendritic spines in the hippocampus of APP/PS1 mice at this early stage.

At intermediate presymptomatic stages (3 months old) APP/PS1 mice display neuronal hypoactivity while astrocytes are still hyperactive. Neuronal hypoactivity is associated with a decreased number of dendritic spines and a reduction of tripartite synapses proportion.

Résumé: La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui affecte progressivement les fonctions cognitives et la mémoire. Le cerveau des personnes atteintes de la MA est caractérisé par le dépôt extracellulaire d'amyloïde- β ($A\beta$), un peptide qui s'agrège au sein de structures appelées "plaques séniles". Cependant, il a été reconnu que les formes solubles oligomériques d' $A\beta$ ($A\beta_o$) sont les formes du peptide qui déclenchent la pathologie. Elles sont impliquées dans des dysfonctionnements synaptiques qui sont considérés comme l'un des premiers événements de la MA. Des études récentes suggèrent que les astrocytes pourraient jouer un rôle majeur dans les dysfonctionnements synaptiques, mais leur implication dans les premiers stades de la MA reste peu documentée. En utilisant l'imagerie calcique, nous avons montré que l'application brève d' $A\beta_o$ sur des tranches aiguës de cerveau de souris induit une hyperexcitabilité calcique astrocytaire dans l'hippocampe. Cette hyperexcitabilité est indépendante de l'activité neuronale et se produit dans les microdomaines des prolongements astrocytaires impliqués dans la formation des synapses tripartites. Dans la même échelle de temps, nous avons observé une hyperactivité au sein des neurones voisins, en utilisant des enregistrements par patch-clamp en configuration cellule entière. Cette hyperactivité dépend de la signalisation calcique dans le réseau astrocytaire. De manière intéressante, l'inhibition du canal calcique TRPA1, exprimé dans les astrocytes, bloque l'effet d' $A\beta_o$ et restaure l'activité des astrocytes et des neurones à un niveau basal. Par ailleurs, l'inhibition chronique de TRPA1 dans le modèle de souris APP/PS1-21 de la MA bloque les perturbations neuronales et astrocytaires précliniques et prévient les troubles de l'apprentissage. En somme, ce travail de thèse suggère un rôle essentiel pour l'hyperexcitabilité précoce astrocytaire dans la pathogenèse de la MA, et souligne que TRPA1 est une cible thérapeutique prometteuse avec un effet neuroprotecteur.

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that progressively affects cognitive functions and memory. AD brains are characterized with the extracellular deposition of amyloid- β ($A\beta$), a peptide that aggregates in structures named "senile plaques". However, it has been recognized that oligomeric soluble forms of $A\beta$ ($A\beta_o$) are the pathology-triggering form of the peptide. They are involved in synaptic dysfunctions which are thought to be one of the earliest events in AD. Recent studies suggest that astrocyte could play a major role in synaptic dysfunctions but their involvement in early stages of AD remained largely undefined. By using calcium imaging we showed that short term application of $A\beta_o$ on mice acute brain slices induces astrocytic calcium hyperexcitability in the hippocampus. This hyperexcitability was independent of neuronal activity and occurred in the astrocyte processes microdomains involved in tripartite synapses formation. In the same time-scale, we observed hyperactivity in neighboring neurons, using whole-cell patch-clamp recordings, which depends on calcium signaling in astrocyte network. Strikingly, the inhibition of astrocytic calcium channel TRPA1 blocked the effect of $A\beta_o$ and reversed both astrocyte and neuron activity toward physiological range. Interestingly, chronic inhibition of TRPA1 in APP/PS1-21 mouse model of AD, blocked both neuron and astrocyte dysfunctions at preclinical stages and prevented learning impairments. Overall, this thesis work suggests a critical role for early astrocyte hyperexcitability in pathogenesis of AD and highlights TRPA1 as an interesting therapeutic target with neuroprotective effect.