



HAL
open science

Contribution à l'étude des conséquences de l'épilepsie sur le développement cérébral et l'activité des cellules microgliales

Alexandre Brenet

► **To cite this version:**

Alexandre Brenet. Contribution à l'étude des conséquences de l'épilepsie sur le développement cérébral et l'activité des cellules microgliales. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Paris Cité, 2021. Français. NNT: . tel-03738770

HAL Id: tel-03738770

<https://hal.science/tel-03738770>

Submitted on 26 Jul 2022

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

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

Université de Paris

École doctorale Bio SPC - ED 562

Laboratoire INSERM / UMR 1141

Contribution à l'étude des conséquences de l'épilepsie sur le développement cérébral et l'activité des cellules microgliales

Par Alexandre Brenet

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Nadia Soussi-Yanicostas

Présentée et soutenue publiquement le 25 Juin 2021

Devant un jury composé de :

Étienne Audinat	DR	Université de Montpellier	Rapporteur
Mireille Rossel	CR-HDR	Université de Montpellier	Rapporteuse
Stéphane Auvin	PU-PH	Université de Paris	Examinateur
Laurent Bezin	CR	Université de Lyon 1	Examinateur
Nadia Soussi-Yanicostas	DR	Université de Paris	Directrice de thèse



Résumé

L'épilepsie est une maladie neurologique qui touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Elle se caractérise par des crises récurrentes dues à la surexcitation synchrone et spontanée de populations neuronales du cerveau. Les crises sont de nature très variable et les symptômes dépendent de la zone du cerveau touchée et de son étendue. Le terme «troubles épileptiques» est par conséquent préféré. Ceux-ci peuvent avoir de nombreuses causes, soient génétiques (par exemple, le syndrome de Dravet, une épilepsie infantile rare, provoquée dans 80% des cas par la mutation hétérozygote du gène *SCN1A*), soient environnementales (par exemple, après un empoisonnement aux organophosphorés, des composés présents dans les pesticides et les agents de guerre neurotoxiques). Dans les deux cas, les traitements actuels ne permettent pas un contrôle optimal des crises. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces différentes formes d'épilepsie est donc nécessaire pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux anticonvulsivants. Les cellules microgliales, les macrophages résidents du cerveau ont de nombreuses fonctions qui varient en fonction de la maturité du cerveau. Les microglies sont les gardiennes de l'homéostasie cérébrale, assurant en permanence le bon fonctionnement des neurones. Ce sont des cellules immunitaires capables de moduler leur activité en fonction des dangers qu'elles détectent. De plus, elles ont un rôle particulier dans la plasticité synaptique et la modulation de l'excitabilité neuronale. Ces différents rôles ont suscité de nombreuses hypothèses sur l'implication de ces cellules dans la physiopathologie des troubles épileptiques. Pour certaines, les microglies sont nocives pour l'excitabilité des neurones, par leur activation et la sécrétion chronique de cytokines pro-inflammatoires. Pour d'autres, elles ont un rôle bénéfique, la microglie tamponnant l'hyperexcitabilité neuronale et diminuant ainsi la fréquence des crises.

L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier les mécanismes de l'épileptogénèse impliquant les cellules microgliales afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. J'ai développé deux modèles d'épilepsie chez le poisson zèbre, un modèle génétique du syndrome de Dravet et un modèle d'empoisonnement aux organophosphorés. Ceux-ci m'ont permis d'étudier les modifications du système nerveux central au cours de l'épileptogénèse. J'ai ainsi montré un déséquilibre de la balance exciteur/inhibiteur vers l'excitation qui pourrait déclencher des crises d'épilepsie. En utilisant le modèle de Dravet, j'ai également caractérisé les changements morphologiques, comportementaux et moléculaires des cellules microgliales après des crises. Ces travaux améliorent notre compréhension des conséquences des crises d'épilepsie dans le cerveau et contribuent à ouvrir la voie à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter différentes formes d'épilepsie.

Mots-clés : Épilepsie ; Syndrome de Dravet ; *SCN1A* ; Empoisonnement par les organophosphorés ; Crises d'épilepsie ; Imagerie calcique ; Électrophysiologie ; Balance excitation/inhibition ; Défauts du neurodéveloppement ; Cellules microgliales ; Neuroinflammation ; Modèle animal ; Poisson zèbre

Abstract

Epilepsy is a neurological disease affecting some 50 million people worldwide. It is characterized by recurrent seizures due to the synchronous and spontaneous overexcitation of neuronal populations in the brain. Seizures vary widely in nature, and symptoms depend on the area of the brain affected and its extent. The term 'epileptic disorders' is accordingly preferred. These can have many causes, including both genetic (e.g. Dravet syndrome, a rare infantile epilepsy caused in 80% of cases by the heterozygous mutation of the *SCN1A* gene), and environmental (e.g. after poisoning with organophosphates, compounds present in pesticides and neurotoxic warfare agents). Whether for Dravet syndrome or organophosphate poisoning, current treatments do not enable optimal control of seizures. A better understanding of the pathophysiology of these different forms of epilepsy is thus needed to find new therapeutic targets and new anticonvulsants.

Microglial cells are the resident macrophages in the brain. These cells have many functions, which can vary depending on the maturity of the brain. The microglia are the guardians of cerebral homeostasis, continuously ensuring the proper functioning of neurons. They are immune cells able to modulate their activity according to the dangers they detect. In addition, microglia have a special role in synaptic plasticity and the modulation of neuronal excitability. These different roles have prompted numerous hypotheses on the involvement of these cells in the pathophysiology of epileptic disorders. In some, microglia are harmful for the excitability of neurons, through their activation and the chronic secretion of pro-inflammatory cytokines. Others lend them a beneficial role, with microglia buffering neuronal hyperexcitability and thus decreasing the frequency of seizures.

The objective of my PhD work was to study the mechanisms of epileptogenesis involving microglial cells in order to identify new therapeutic targets. I developed two models of epilepsy in zebrafish, a genetic model of Dravet syndrome and a model of organophosphate poisoning. These enabled me to study the modifications of the central nervous system during epileptogenesis. I specifically demonstrated an excitatory/inhibitory imbalance toward excitation that could trigger epileptic seizures. Using the Dravet model, I also successfully characterized the morphological, behavioral and molecular changes of microglial cells after seizures. This work improves our understanding of the consequences of epileptic seizures in the brain and helps pave the way for the discovery of new therapeutic targets to treat different forms of epilepsy.

Keywords: Epilepsy; Dravet syndrome; *SCN1A*; Organophosphate poisoning; epileptic seizures; Calcium imaging; Excitation/inhibition balance; Neurodevelopment defaults; Microglial cells; Neuroinflammation; Animal model; Electrophysiology; Zebrafish; Neurodevelopmental disorders

**« Qui que l'on soit au fond de nous,
nous ne sommes jugés que par nos actes »**

**Film Batman Begins
Rachel Dawes**

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier Mireille Rossel et Étienne Audinat d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je les remercie sincèrement pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et la correction de ce mémoire. Je remercie aussi Laurent Bezin et Stéphane Auvin d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance.

Je tiens ensuite à remercier Nadia Soussi-Yanicostas pour m'avoir accueilli dans son équipe lors de mon projet de fin d'études, puis pour m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mon travail en thèse. Je remercie Constantin Yanicostas pour ses explications et ses critiques poussées. Nos discussions, sur des sujets divers et variés, m'auront permis d'accroître ma culture générale. Merci à Viviane Romain pour sa gentillesse et son écoute. Merci pour tous ces bons repas que tu nous auras faits (ce poulet Colombo, un vrai délice!!). À tous ces punchs pour nous rendre joyeux. Merci d'avoir apporté de la gaîté et de la légèreté dans ce monde où le travail est omniprésent.

Merci à tous les stagiaires et anciens membres de l'équipe. Je pense notamment à Amina Lebcir, Widad Ghedamsi, Foulémata Tirera, Thivya Jeyaranjan, Gavshalya Ravichandran, Salima Brouri, Eliana El Dawra, Myriem Hadi, Joan Floridor, Noémie Chen et Léna Cattai. Merci plus particulièrement à Rahma Hassan-Abdi pour m'avoir formé au début de mon stage, ainsi que pour m'avoir suivi tout au long de ma thèse (enfin presque). Tu m'as mis directement sur de bons rails grâce à tes conseils avisés, ta patience et ton incroyable pédagogie. Merci à Solène Renault qui m'aura accompagné au cours de mon stage ainsi qu'au début de ma thèse. Merci à Valentin Clivot, fournisseur officiel de champagne et de bonne humeur!! Merci au trio d'enfer : Florence Uriac (Pompot'), Michael Kemogni (Mace Windu) et Paul Nazac (BB-8). Je suis à la fois content et triste de terminer ma thèse avec vous. Content parce que l'on aura passé de supers moments malgré la fermeture des bars, et triste parce que ces moments vont se terminer. Pompot', même si ce fut compliqué, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec une stagiaire investie et rigoureuse comme toi. Continues comme ça, tu réussiras!! BB-8, je ne dirais pas que tu es le meilleur stagiaire avec qui j'ai pu travailler, celui avec qui je me suis le mieux entendu, celui avec les meilleurs goûts musicaux et filmographiques, avec les mêmes délires ! Non, je ne dirais pas tout ça, mais c'était tout de même super méga génial de t'avoir rencontré et de travailler avec toi!! Je sais que tu y arriveras car tu as toutes les compétences, les connaissances et les qualités pour réussir!!

Merci aux membres de l'unité U1141 avec qui j'ai passé d'incroyables moments durant les nombreux barbecues et autres repas de Noël. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir au cours de mon stage puis de ma thèse, que ce soit dans les bons moments comme dans les moins bons... Merci plus particulièrement à Pierre Gressens pour sa disponibilité, son écoute et ses conseils. Merci à Julien Pansiot pour nos matchs de tennis d'avant pandémie, un véritable défouloir pour moi ! Merci à Sophie Lebon pour ses browkies et ses tiramisus tellement bons !!! Merci aussi de m'avoir permis de mettre à contribution mon amour pour les tableaux Excel en m'offrant de participer à l'organisation des paris lors des différentes

coupes du monde/euros de football. J'ai vraiment adoré ces moments de convivialité. Merci à Kheira Abdelmoumene pour avoir toujours été là pour moi (même si parfois je me faisais crier dessus). Merci à Hélène Cwerman-Thibaut et Gwendoline Le Guilloux pour votre écoute et votre accueil. Merci à Cindy Bokobza et Alice Jacquens pour avoir essayé de dynamiser les étudiants, doctorants et post-doctorants en créant les « Zinzins du Labo », ce qui nous a permis d'échanger des idées autour de présentations et de décompresser autour d'un verre!

Ces quatre années auront été pleines de très belles rencontres. Maud Ringot (la maman) et Amélia Madani (la mamie), merci pour votre présence, savoir qu'il est possible de compter sur vous fut d'une grande aide au cours de ma thèse (surtout vers la fin...). Amazigh Mokhtari (le boutentrain de la bande), merci pour ton humour piquant (ça réveille!!!), pour ta répartie, et pour m'avoir entraîné dans R. Alexandra Albert (la doyenne et alcoolique #1) et Éléonore Sizun (la jeunette et alcoolique #2), merci pour ces soirées clandestines, nos parties de Seven Wonders, de 6 qui prend ou de salade de cafards, vous m'avez vraiment permis de décompresser et de survivre durant la dernière ligne droite de la thèse (sans oublier Jérémie Dalous!). Merci à vous tous pour votre immense soutien, vos conseils, votre écoute, votre énergie, vous êtes des personnes extraordinaires sans qui ma thèse aurait eu une tout autre tournure... Merci aussi pour ce séjour au ski que je n'oublierai jamais (même si j'omets volontairement deux personnes à ce moment des remerciements...). Merci pour ces soirées aux bars à commérer, décompresser, rire, mettre le labo entre parenthèses. Et ce n'est pas fini, le Corcoran's nous attend pour de nouvelles aventures!!

S'ouvre enfin le volet des remerciements à mes proches (même si je considère beaucoup de personnes citées précédemment comme mes proches).

À un moment de ma thèse, à force de foncer tête baissée dans les manips, les manips, les manips, je m'étais tellement isolé, que j'en ai presque oublié mes amis! C'est fou quand même... mais c'est surtout triste! Alors je tiens à remercier Alan pour nos courses de karting. Maintenant que j'ai fini ma thèse, on va pouvoir reprendre. Mathilde, merci pour tout, pour être là, pour ton soutien depuis les 12 ans que l'on se connaît. Mon cerveau sera toujours le tien à réparer!! La distance et le travail n'auront jamais raison de notre amitié! Maintenant que j'ai un peu plus le temps, je vais enfin pouvoir passer te voir sur Saint-Étienne. Aux ENSCMiens, Clément, Jim, Maï et Thibault. Nos séjours chez les uns et les autres, Oxford, Londres, Marseille, Paris, auront été une véritable bouffée d'air frais pour moi. De même que nos jeudis après-midi jeu pendant le premier confinement, ainsi que nos Skype réguliers pour partager une série, pour jouer à des jeux de sociétés ou tout simplement pour discuter, et cela jusqu'au bout de la nuit! De véritables moments de détente, de partage, d'amitié que je ne laisserai jamais s'éteindre! Là encore je ne sais que dire pour vous remercier. Vous remercier pour votre soutien plus qu'immense, pour votre disponibilité, pour votre écoute, pour vos conseils. Merci pour être là tout simplement. Mais ça y est. Je suis le premier à avoir franchi la ligne d'arrivée. Je vous attends de l'autre côté!

Avant de finir avec ma famille, j'aimerais prendre quelques instants pour plusieurs mentions spéciales :

À Olivier Bar (Technicien à l'animalerie poisson zèbre, de l'unité U1141, domiciliée au 3^{ème} étage point rouge du bâtiment Écran, de l'hôpital Robert Debré, 48 Bd Sérurier, 75019, Paris, France, Europe, Terre, Système Solaire, Voie Lactée, Univers). Que d'aventures Olivier ! Entre les fous rires à l'animalerie, les matchs de tennis, les discussions dans le métro, au téléphone, etc. Difficile de tout mentionner ici. Tu as été un élément essentiel de ma thèse, par ta gentillesse, ton attention, ton humour, ton souci d'autrui. Merci pour tout. Merci d'avoir su me remonter le moral, d'avoir su me changer les idées en discutant de Roland Garros, de Formule 1, de football. Tu as été un réel soutien.

À Marisol Corral. Que de soirées passées à discuter, échanger, débattre, de politique, de sciences, de psychologie, de l'avenir. Je ne saurais jamais assez te remercier d'avoir été un des piliers de ma thèse et de sa réussite. Alors merci. Merci pour ton temps, ton écoute sans pareil, ta patience, ta disponibilité, ta gentillesse, ton immense soutien, tes précieux conseils. Merci d'avoir évité que je me noie en me repêchant lorsque j'étais au plus mal. Merci mille fois!!

À Julie Somkhit (Bon là on attaque le dur...). Je risque certainement d'oublier beaucoup de choses, mais comment ne pas te remercier ! C'est littéralement impossible. Tu es (malheureusement pour toi) au centre de ma thèse. Mon acolyte de thèse, mon souffre-douleur, ma confidente, Leia la rebelle. Ton arrivée dans l'équipe a changé tellement de choses pour moi. Ce fut un véritable choc, un ouragan, un séisme. Moi qui étais recroquevillé sur moi, la tête dans les manips, vivant 24h/24h au labo, je dois dire que c'est grâce à toi que je me suis ouvert au reste de l'unité, à l'extérieur du labo, à la vie! Je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait et tout ce dont tu n'as peut-être pas conscience. Tu as été le pilier le plus important de ma thèse. Parfois la seule et unique raison me faisant venir au labo. J'aurais quelques fois, voire bien plus, été un véritable casse-couille, un gros con, un petit emmerdeur. Mais tu auras réussi (du moins en partie) là où beaucoup se sont cassé les dents : me faire ouvrir les yeux!! Certes à coup de claques, mais ça a fonctionné. Je pense sincèrement que l'on peut dire qu'on aura vécu beaucoup de choses tous les deux. Beaucoup de hauts, de bas, de crises, de larmes, ... Cette dernière ligne droite ne fut pas simple mais nous y sommes arrivés. J'insiste sur le NOUS car je suis persuadé que tu passeras une aussi belle thèse que moi, voire encore plus belle. Tu es une personne extraordinaire, par ton intelligence, ta vivacité, ta réflexion minutieuse, ta patience, ton sérieux, ton sens de la vie, ton écoute, ta constante pertinence, ton altruisme. Tant de qualités qui font de toi une excellente doctorante ! Alors même si un simple merci ne saurait exprimer ce que je ressens, ma gratitude, ma reconnaissance. Je te le dis quand même : MERCI!

Je garde bien sûr les mots de la fin pour ma famille. Valérie, Hervé. Merci de m'avoir accueilli pendant de nombreuses années chez vous pour profiter du soleil, de la mer, de vous. Chaque visite m'a fait un bien fou! De vrais moments de détente! (Hervé, j'espère que tu auras lu la thèse en entier et que tu auras plein de questions). Pépé. J'en aurai fait du chemin depuis les mercredis après-midi passé au 27 à démêler les pelotes de laines de mémé, à jouer au 7 familles ou au UNO après avoir mangé un steak haché bien cuit avec des pommes de terre à

la poêle et une salade de tomates. Que de souvenirs. Je dirais même, que de très bons souvenirs!! Alors, merci. Tonton. Que de temps passé à jardiner, à couper du bois, à construire un barrage, les pique-niques à la Sèvres, aller à la pêche aux écrevisses dans le marais poitevin, à la pêche aux moules et aux crevettes à Saint Michel Chef Chef, les visites de Nantes, les journées au Puy du Fou ou au Futuroscope. Mais qu'est-ce que j'adorais mes vacances quand j'étais petit et toujours maintenant d'ailleurs!! Mamie. Après avoir survécu aux compotes de pomme maison, aux ragoûts de bienvenue, aux lapins choisis le matin même par mes soins à la ferme du coin pour être dégusté à midi, ... Ça y est, ton petit mignon est docteur!! J'espère que tu le diras à toutes les personnes que tu croieras, à des polonais croisés un jour de pêche, à des anglais pendant la visite d'un château, à des allemands pour aller faire le tour de fort Boyard en bateau, à des russes au bourg 1900. Même s'ils ne le comprennent pas, je suis sûr que tu leur diras!! Merci à vous deux, ainsi qu'à papi que je n'oublie pas bien sûr, pour toutes ces vacances d'été inoubliables, ces visites de notre patrimoine que sont, entre autres, les châteaux de la Loire, ces journées de pêche à la Sèvre, au passage du gois, à la mer. Merci pour tout, pour votre affection, pour votre générosité sans limite, pour votre tendresse. MERCI! Et enfin, le plus important et le plus dur pour la fin. Papa, Maman. Pas facile de trouver les mots justes. Le jour de ma remise de diplômes à l'ENSCM, je n'avais pas su trouver les mots pour vous remercier, j'avais préféré plaisanter en vous résumant à une source d'argent. Que c'était réducteur et immensément injuste... Mais voilà, c'est le moment de trouver les mots. Les bons mots. Vous êtes des parents formidables. Vous m'avez donné un cadre de vie et une éducation sans pareil. Je me souviens des heures passées à apprendre les lettres, les chiffres, l'heure (une torture cette horloge en bois ...), à réciter les tables de multiplication, les leçons d'histoire/géo, à préparer le bac français, à relire ce manuscrit de thèse... Les mercredis après-midi passés au lycée pour assister aux TP des olympiades de la chimie avec ma mère. Des heures passées à bricoler avec mon père. A poser du parquet, du lambris, à faire de l'électricité, de la plomberie, à creuser des tranchées pour retrouver un fourreau, à construire un abri de jardin, une serre. Mine de rien j'en aurai passé du temps à tenir une lampe sans jamais éclairer au bon endroit... Le temps passé dans le jardin à arracher les patates, écosser les petits pois, équeuter les haricots verts, couper les gourmands des tomates, démarier les carottes. Les promenades dans le bois, au Quesnoy, autour de l'étang. Les dimanches matin au karting avec mon père, les sorties en buggy. Et tout ce que je n'ai pas le temps de citer... Vous m'avez vraiment donné la meilleure enfance qui soit, la meilleure éducation qui soit, et le plus important je pense, vous m'avez toujours laissé le choix de faire ce que je voulais. Quand j'ai choisi de faire prépa, quand je suis parti à Montpellier, quand je suis allé en Irlande, quand j'ai commencé cette thèse. Vous m'avez laissé faire des erreurs et vous m'avez soutenu quoi qu'il arrive. Et pour ça je ne vous remercierai jamais assez. Cette thèse, ce n'est pas que la mienne, c'est aussi la vôtre, car sans vous je ne serais pas là où j'en suis maintenant. J'espère que vous êtes fiers de moi. A vrai dire je le sais! Je finirai par quelque chose que je ne vous ai peut-être jamais dit : Papa, Maman, je vous aime!!

Sommaire

Résumé.....	2
Abstract.....	3
Remerciements.....	5
Sommaire	9
Tables des figures	13
Tables des tableaux.....	13
Abréviations	14
CHAPITRE I : INTRODUCTION	16
1. L'épilepsie : Une maladie neurologique très commune	17
1.1. Définition	17
1.1.1. Qu'est-ce que l'épilepsie ?	17
1.1.2. Les crises d'épilepsie.....	18
1.1.3. L'impact des crises sur la vie quotidienne et les traitements actuels	19
1.2. Les épilepsies d'origine génétique	21
1.2.1. Le syndrome de Dravet.....	21
1.2.1.1. Qu'est-ce qu'un syndrome épileptique ?	21
1.2.1.2. Historique : l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson	21
1.2.1.3. Les caractéristiques cliniques du syndrome de Dravet	23
1.2.2. Un syndrome causé par des mutations <i>de novo</i>	24
1.2.2.1. Les canaux sodiques voltage-dépendants.....	24
1.2.2.2. Les mutations du gène <i>SCN1A</i>	26
1.2.3. Les traitements	28
1.2.3.1. La stratégie thérapeutique	28
1.2.3.2. Les molécules en développement	30
1.2.3.3. La gestion des comorbidités	31
1.3. Les épilepsies d'origine environnementales.....	32
1.3.1. Les organophosphorés.....	32
1.3.1.1. Propriétés	32
1.3.1.2. Utilisations historiques	33
1.3.2. La toxicité des organophosphorés	34
1.3.2.1. Les synapses cholinergiques : rôle et fonctionnement.....	34
1.3.2.2. L'inhibition de l'AchE par les OPs et les symptômes induits.....	35
1.3.3. Les contrepoisons et les traitements actuels.....	36
2. Les cellules microgliales : actrices dans les épilepsies	37
2.1. Qu'est-ce que la microglie ?.....	37
2.2. L'origine de ces cellules	38
2.3. Des cellules pluripotentes.....	40
2.3.1. Les microglies homéostatiques	40
2.3.2. Les microglies activées.....	42
2.4. La microglie dans les épilepsies	44

2.4.1.	La neuroinflammation : un acteur principal dans la physiopathologie des épilepsies ?	45
2.4.2.	Un élagage synaptique non contrôlé	47
2.4.3.	Un contrôle de l'activité neuronale	49
2.5.	<i>La microglie comme nouvelle cible thérapeutique</i>	51
3.	Le poisson zèbre comme modèle d'épilepsie	51
3.1.	<i>Le poisson zèbre : un modèle vertébré au cœur de la recherche en biologie</i>	51
3.1.1.	Description du poisson zèbre	51
3.1.2.	De l'étude du développement embryonnaire à la toxicologie	52
3.1.3.	Un modèle pour l'étude des maladies neurologiques humaines	53
3.1.4.	Un outil de choix pour la médecine « personnalisée ».....	55
3.2.	<i>Intérêt pour les épilepsies</i>	55
3.2.1.	Génération de modèles rapides et simplifiés.....	55
1.3.3.1.	Inactivation transitoire d'un gène ciblée	56
1.3.3.2.	Génération de lignées KO stable	56
3.2.2.	Visualisation en 3D et non invasive de l'activité neuronale.....	57
3.2.3.	Une activité motrice reflétant l'hyperexcitation neuronale	60
3.2.4.	Un animal au service du criblage de molécules thérapeutiques	61
3.3.	<i>Les modèles d'épilepsies chez le poisson zèbre</i>	62
3.3.1.	Les modèles pharmacologiques : le PTZ.....	62
3.3.2.	Les modèles génétiques.....	64
	Objectifs de la thèse	70
	CHAPITRE II : MATÉRIELS & MÉTHODES	71
1.	<i>Élevage et lignées utilisées</i>	72
1.1.	Conditions d'élevage	72
1.2.	Obtention et élevage des embryons	72
1.3.	Lignées utilisées	72
2.	<i>Utilisation de morpholinos oligonucléotides anti-sens</i>	73
2.1.	Séquence des morpholinos utilisés.....	73
2.2.	Micro-injection des embryons.....	73
3.	<i>Traitement à la carbétocine</i>	74
4.	<i>Étude de l'excitabilité neuronale</i>	74
4.1.	Imagerie calcique	74
4.2.	Électrophysiologie	74
5.	<i>Étude de l'activité locomotrice</i>	75
6.	<i>Marquage de la mort cellulaire</i>	75
6.1.	L'acridine orange.....	75
6.2.	L'immuno-détection de la caspase-3 activée.....	76
7.	<i>Étude du profil inflammatoire</i>	77
7.1.	La RT-qPCR.....	77
7.2.	Il-1 β	77
8.	<i>Étude de la distribution des synapses excitatrices</i>	78
9.	<i>Observation des cellules microgliales</i>	79
9.1.	Étude de leur morphologie	79

9.2. Étude de leur dynamique.....	80
10. Analyse des données, graphique et statistiques	80
CHAPITRE III : RÉSULTATS	81
<i>Avant-Propos</i>	82
<i>Premier article. “Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome”</i>	<i>83</i>
<i>Résumé de l'article</i>	<i>83</i>
<i>Article</i>	<i>84</i>
<i>Deuxième article. “Étude de l'impact des crises d'épilepsie sur les cellules microgliales et leur rôle neuro-protecteur”.....</i>	<i>97</i>
<i>Résumé de l'article</i>	<i>97</i>
<i>Introduction</i>	<i>97</i>
<i>Résultats.....</i>	<i>98</i>
Caractérisation de la morphologie des cellules microgliales dans le modèle Dravet.....	98
Étude de la dynamique microgliale dans le modèle Dravet	99
Étude du profil inflammatoire des embryons scn1Lab-KD	100
Études des conséquences de l'ablation génétique des cellules microgliales sur l'activité neuronale des embryons Dravet	101
Études des conséquences de l'ablation génétique des cellules microgliales sur l'activité locomotrice des embryons scn1Lab-KD.....	101
<i>Figures</i>	<i>103</i>
<i>Troisième article. “La carbétocine, agoniste de l'ocytocine, réduit les crises d'épilepsie et leurs comorbidités dans le modèle scn1Lab du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre”</i>	<i>110</i>
<i>Résumé de l'article</i>	<i>110</i>
<i>Introduction</i>	<i>110</i>
<i>Résultats.....</i>	<i>111</i>
La carbétocine rétablit la répartition des trois populations de cellules microgliales chez les embryons scn1Lab-KD.....	111
La carbétocine rétablit l'activité locomotrice des embryons scn1Lab-KD à un niveau basal.....	112
La carbétocine réduit l'hyperexcitabilité neuronale des embryons scn1Lab-KD.....	113
Le traitement à la carbétocine réduit la mort cellulaire cérébrale des embryons scn1Lab-KD	113
La carbétocine restaure la densité des synapses excitatrices dans le modèle scn1Lab-KD	114
<i>Figures</i>	<i>115</i>
<i>Quatrième article. “Organophosphorus diisopropylfluorophosphate intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death”</i>	<i>122</i>
<i>Résumé de l'article</i>	<i>122</i>
<i>Article</i>	<i>123</i>
CHAPITRE IV : Discussion	136
<i>Épilepsies et Microglies</i>	<i>137</i>
Le déséquilibre de la balance synaptique excitation/inhibition et défaut des systèmes inhibiteurs	137
La mort neuronale dans les épilepsies	139
Activation microgliale, neuro-inflammation et crises d'épilepsie	140
Implication des cellules microgliales dans les crises épileptiformes.....	143
La modulation de l'activité microgliale	144
<i>Les apports du poisson zèbre</i>	<i>146</i>
L'imagerie calcique	146
L'étude <i>in vivo</i> de la dynamique des cellules microgliales.....	148

<i>Limitations des études</i>	149
CHAPITRE V : CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	152
<i>Conclusions</i>	153
<i>Perspectives</i>	155
Étude de l'implication de la balance excitation/inhibition dans l'initiation des crises d'épilepsies	155
Étude longitudinale des modifications biologiques impliquées dans l'hyperexcitabilité neuronale	156
Étude comparative du transcriptome des cellules microgliales dans différents modèles d'épilepsies chez le poisson zèbre.....	156
ANNEXES	159
<i>Avant-Propos</i>	160
Article annexe 1. “Neurons expressing pathological Tau protein trigger dramatic changes in microglia morphology and dynamics”	161
<i>Présentation de l'article</i>	161
<i>Article</i>	162
Article annexe 2. “A fast, simple, and affordable technique to measure oxygen consumption in living zebrafish embryos”	173
<i>Présentation de l'article</i>	173
<i>Article</i>	174
Article annexe 3. “Bixafen, a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, causes microcephaly and motor neuron axon defects during development”	177
<i>Présentation de l'article</i>	177
<i>Article</i>	178
BIBLIOGRAPHIE	186

Tables des figures

Figure 1 : Classifications des crises d'épilepsie	19
Figure 2 : Représentation schématique des manifestations cliniques du syndrome de Dravet et de leur incidence relative en fonction de l'âge	22
Figure 3 : Architecture des canaux $Na_v1.1$	25
Figure 4 : Localisation et type de mutations du canal $Na_v1.1$ chez les patients atteints d'épilepsie....	27
Figure 5 : Proportion des gènes associés à un phénotype du syndrome de Dravet	28
Figure 6 : Stratégie thérapeutique dans le syndrome de Dravet	30
Figure 7 : Comorbidités dans le syndrome de Dravet	32
Figure 8 : Structures des OPs	33
Figure 9 : Schéma du fonctionnement d'une synapse cholinergique en absence et en présence d'OP	35
Figure 10 : Mécanisme d'inhibition de l'AchE par les OPs et potentiel traitements.....	36
Figure 11 : Colonisation du cerveau par les cellules macrophages primitifs au cours du développement embryonnaire chez la souris	39
Figure 12 : Schéma de la colonisation du cerveau de poisson zèbre par les cellules microgliales en deux vagues distinctes	40
Figure 13 : États d'activation des cellules microgliales : polarisation M1/M2	44
Figure 14 : Rôles potentiels des cellules microgliales dans l'épileptogénèse	45
Figure 15 : Cercle vicieux de la neuroinflammation dans les épilepsies	46
Figure 16 : Mécanisme d'élagage synaptique en condition physiologique et dans un cerveau hyperactif	48
Figure 17 : Hypothèse du mécanisme de modulation de l'activité neuronale par les cellules microgliales	50
Figure 18 : Chronologie du développement du poisson zèbre.....	52
Figure 19 : Exemple d'imagerie calcique chez l'embryon de poisson zèbre	58
Figure 20 : Modulation de l'activation des cellules microgliales par la carbétocine et conséquences sur l'hyperexcitabilité neuronale dans les embryons <i>scn1Lab</i> -KD	145
Figure 21 : Corrélation entre l'activité électrique des neurones et les variations de la concentration intraneuronale des ions calciques.....	147

Tables des tableaux

Tableau 1 : Liste des molécules antiépileptiques les plus communes	20
Tableau 2 : Corrélation des gènes codant les différentes sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants chez l'Homme et le poisson zèbre	26
Tableau 3 : Liste des molécules en développement et en tests cliniques pour le syndrome de Dravet	31
Tableau 4 : Liste des modèles génétiques d'épilepsie chez le poisson zèbre	67

Abréviations

AA	Absence atypique	EEG	Électroencéphalogramme
A.C.	Adénylate Cyclase	e.g.	exempli gratia (latin de « par exemple »)
ACh	Acétylcholine	EGC	Épilepsie Généralisée Cryptogénique
AChE	Acétylcholinestérase	EGCF+	Épilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles plus
ADN	Acide désoxyribonucléique	E/I	Excitation/Inhibition
ADN	Acide désoxyribonucléique codant	EIICGTC	Épilepsie Idiopathique Infantile avec Crises Généralisées Tónico-Cloniques
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate	EISPE	Épilepsie Idiopathique Sévère de la Petite Enfance
ARN	Acide ribonucléique	ESX	Éthosuximide
ARNm	Acide ribonucléique messager	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ATP	Adénosine triphosphate	FIZZ1	<i>Found in Inflammatory Zone 1</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>	GABA	Acide γ -aminobutyrique
CaCl₂	Chlorure de calcium	GDNF	<i>Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i>
CF	Crise fébrile	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
CLB	Clobazam	GTP	Guanosine triphosphate
CM	Crise myoclonique	GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
CMG	Crise moteur généralisée	HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
COX-2	cyclooxygénase-2	HI-6	Asoxime
CPC	Crise partielle complexe	hpf	heures post-fécondation
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
DAMPs	<i>Damaged-Associated Molecular Patterns</i>	IL-1β	interleukines-1 β
DA	Démarche Accroupie	IL-4	interleukines-4
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	IL-6	interleukines-6
DD	Délai de Développement	IL-8	interleukines-8
DFP	Diisopropylfluorophosphate	IL-10	interleukines-10
DMSO	Diméthylsulfoxyde	IL-13	interleukines-13
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione	ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
DZP	Diazépam		
EA	Encéphalopathie aiguë		
EAM	Épilepsie Asiatique Myoclonique		

INFγ	Interféron- γ	PBMC	<i>Péripheal Blood Mononuclear Cell</i>
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase	PBS	<i>Phosphate- Buffered Saline</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	PDE	Épilepsie Pyridoxino-Dépendente
IV	Intraveineux	PRRs	Pattern Recognition Receptors
J.-C.	Jésus Christ	PTU	Phénylthiourée
jpf	jours post-fécondation	PTZ	Pentylènetétrazole
KA	Acide kaïnique	qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
KCl	Chlorure de potassium	RIG1	<i>Retinoic acid-Inducible Gene-1</i>
KD	<i>Knockdown</i>	RLRs	<i>RIG1-Like Receptors</i>
KO	<i>Knock-out</i>	RT	<i>Reverse Transcription</i>
LEV	Levetiracetam	SD	Syndrome de Dravet
LPS	Lipopolysccharide	SE	<i>Status Epilepticus</i>
MgCl₂	Chlorure de magnésium	sem	Écart type à la moyenne
MO	Morpholino	SH	Sensibilité à l'Hyperthermie
MSIE	Mort Subite et Inexpliquée en Épilepsie	SI	Spasmes Infantile
NF-κB	<i>Nuclaeal Fator-kappa B</i>	SNP	Système Nerveux Périphérique
NLRs	<i>Nod-Like Receptors</i>	SNC	Système Nerveux Centrale
NMDA	N-méthyl-D-aspartate	spf	semaine post-fécondation
NaCl	Chlorure de sodium	STP	Stiripentol
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>	TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
nod	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>	TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
OBX	Obodoxime	TNFα	<i>Tumor Factor Necrosis α</i>
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques	TPM	Topiramate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	TREM2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
OP	Organophosphoré	VPA	Acide valproïque
OS	<i>Obtundation Status</i>	Ym-1	chitinase 3-like 3
P2Y	récepteur purinergique métabotropique	ZFN	<i>Zinc Finger Nuclease</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>	ZNS	Zonisamide
		2-PAM	Pralidoxime
		3D	3 dimensions

CHAPITRE I :
INTRODUCTION

1. L'épilepsie : Une maladie neurologique très commune

1.1. Définition

1.1.1. Qu'est-ce que l'épilepsie ?

L'épilepsie est une maladie neurologique courante, caractérisée par une prédisposition à engendrer des crises convulsives (Fisher et al. 2005). Les premières descriptions de cette maladie remontent à plus de 4.000 ans, sur les tablettes d'un manuel de médecine babylonien (Magiorkinis, Sidiropoulou, and Diamantis 2010). Des descriptions de crises d'épilepsie peuvent aussi être trouvées dans des papyrus de l'Égypte ancienne, datant de 1.700 ans av. J.-C. Pendant longtemps, les crises d'épilepsies ont été considérées comme des phénomènes surnaturels ou des manifestations divines. Il faut attendre le Vème siècle av J.-C. pour qu'Hippocrate, reconnu comme le père de la médecine, soit le premier à considérer l'épilepsie comme une maladie du corps : « La maladie dont il s'agit ne me paraît pas plus divine que le reste ; la vérité est que le cerveau est à l'origine de cette maladie, comme de toutes les autres très grandes maladies » (Littré 1849). Malgré cela, l'épilepsie est restée associée, pendant de nombreuses années, à la sorcellerie ou à la possession par des êtres divins ou diaboliques. Il faut attendre le XIXème siècle, avec l'avènement de la neurologie, pour que l'épilepsie soit enfin reconnue comme une maladie à part entière et que les concepts contemporains de cette maladie soient développés.

De nos jours, l'épilepsie est définie par la survenue d'au moins deux crises spontanées (Fisher et al. 2014). D'après une étude épidémiologique de 2017, environ 50 millions de personnes vivent avec de l'épilepsie dans le monde, en faisant la deuxième maladie neurologique la plus commune après les démences. Cette étude souligne aussi que le sexe et l'âge n'influent ni sur la prévalence, ni sur l'incidence de la maladie. Néanmoins, même si les crises peuvent se déclencher à tout âge, les risques sont plus importants au cours de la petite enfance mais aussi après 65 ans, lorsque le cerveau est plus fragile. En effet, dans les premières années de vie, le cerveau est encore en pleine maturation et l'altération de son développement peut mener à des crises d'épilepsie. De l'autre côté, après 65 ans, le cerveau est plus sensible aux agressions que peuvent représenter les accidents vasculaires cérébraux, aux tumeurs et aux maladies neurologiques en générale. Enfin, force est de constater que le taux d'incidence de l'épilepsie dépend largement du niveau de richesse des pays. Ainsi, alors que l'incidence dans les pays riches est de 49 pour 100.000 habitants, ce même taux est trois fois plus important dans les pays à faible PIB (139 pour 100.000 habitants) (Fiest et al. 2017).

Ces chiffres peuvent s'expliquer par le manque de ressources, l'écart de connaissances médicales, les difficultés d'accès aux soins ainsi qu'aux traitements les plus récents, mais aussi par la présence de nombreuses maladies pouvant entraîner des crises d'épilepsie.

1.1.2. Les crises d'épilepsie

Les crises d'épilepsie correspondent à une surexcitation synchrone et spontanée d'un groupe de neurones, plus ou moins important, dans le cerveau. Ces crises peuvent être dues à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition dans le cerveau. Dans un cerveau sain, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) permet de contrebalancer l'excitation neuronale induite par les neurotransmetteurs excitateurs tels que le glutamate. Dans l'épilepsie, tout dysfonctionnement au sein des circuits GABAergiques (réduction de la synthèse du GABA, diminution de la densité des récepteurs post-synaptiques au GABA, problèmes de conduction du potentiel d'action par les neurones GABAergiques, etc.) mène à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition ce qui entraîne une augmentation de l'excitation et le déclenchement des crises (Bonansco and Fuenzalida 2016; Khazipov, Valeeva, and Khalilov 2015; Liu, Grigorovsky, and Bardakjian 2020; McNamara, Huang, and Leonard 2006). Ce défaut de la balance peut se développer à la suite d'un traumatisme crânien, d'une infection du système nerveux central (SNC), d'une tumeur ou lors d'un défaut de développement. De nombreuses études ont mis en cause les cellules microgliales dans le développement et l'aggravation des crises d'épilepsie, notamment *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou par un élagage synaptique non contrôlé causé par l'une ou plusieurs des altérations précédentes (Andoh, Ikegaya, and Koyama 2019). Ces hypothèses seront abordées plus en détail un peu plus loin dans l'introduction.

Les symptômes associés aux crises d'épilepsie dépendent de la zone du cerveau impliquée ainsi que de son étendue. En 2017, la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) a publié une nouvelle méthode pour classer les types de crises (**Figure 1**) (Fisher et al. 2017). Le premier critère se fonde sur la région du cerveau à l'origine de la crise. Si cette dernière est limitée à un seul hémisphère, on dit que la crise est focale. En revanche, si elle concerne les deux hémisphères simultanément, on dit qu'elle est généralisée. Une dernière catégorie regroupe les crises dont on ne connaît pas le lieu d'origine dans le cerveau. Après avoir déterminé la localisation des réseaux neuronaux impliqués dans la crise, le deuxième critère repose sur la présence ou non d'une perte de connaissance pendant la crise, notamment pour les crises

focales, car les crises généralisées entraînent automatiquement une perte de conscience. Le dernier critère concerne les potentielles manifestations motrices de la crise. Ainsi, une crise généralisée peut être tonique (contraction permanente des muscles), tonico-clonique (alternance de contractions et de tremblements), myoclonique (tremblements des muscles), atonique (relâchement général), typique ou atypique (perte de conscience), etc. Les crises focales entraînent un panel de symptômes encore plus large car ces derniers dépendent entièrement de la population de neurones surexcités. Dès lors, les crises focales peuvent ainsi induire une perte de conscience, des défauts moteurs, des hallucinations auditives, sensorielles ou visuelles, des troubles de l'émotion, etc. Enfin, dans de nombreux cas, les crises ne sont même pas détectées par les patients, sauf lors d'un enregistrement EEG. Ainsi, au regard des nombreux symptômes et des nombreux défauts à l'origine des crises, il est difficile de considérer l'épilepsie comme une seule et unique maladie. C'est pourquoi on parle du spectre des troubles épileptiques.

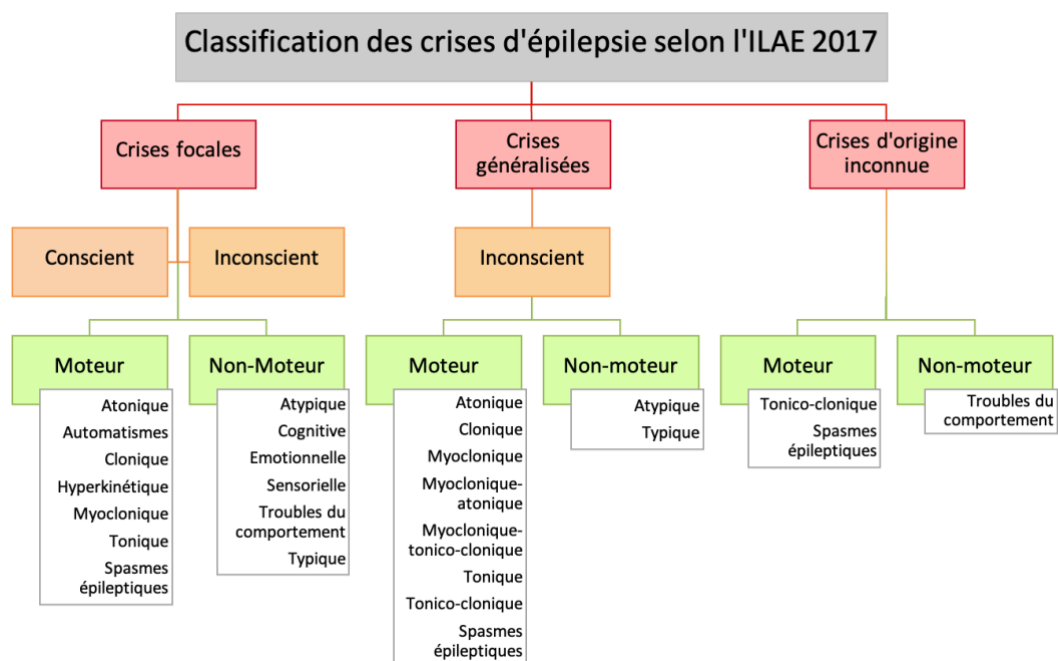


Figure 1 : Classifications des crises d'épilepsie. Méthode de classification des crises d'épilepsie selon (1) leur origine dans le cerveau, (2) leur impact sur l'état de conscience et (3) les potentiels défauts moteurs. Figure adaptée de Fisher et al. 2017.

1.1.3. L'impact des crises sur la vie quotidienne et les traitements actuels

Les crises d'épilepsie sont des événements brusques et sans signes annonciateurs, c'est pourquoi il est impossible de prédire le moment où une crise va survenir, ce qui peut avoir un impact majeur sur la vie quotidienne (professionnelle et personnelle) des patients. Le meilleur

moyen pour diminuer l'impact de cette maladie consiste à réduire la fréquence des crises. Ce contrôle des crises, pouvant aller jusqu'à leur disparition totale, n'est possible que par la prise régulière de molécules anticonvulsives (**Tableau 1**). Les modes de fonctionnement de ces molécules ne sont pas toujours parfaitement connus mais ils sont tous basés sur la modulation de l'activité neuronale, soit en inhibant les neurones excitateurs, soit, à l'inverse, en activant les neurones inhibiteurs (Howard et al. 2011). Cependant, ces molécules ne sont que des traitements purement symptomatiques imposant tout au long de la vie la prise de médicaments qui ont souvent de forts effets secondaires. De plus, ces traitements ne sont efficaces que chez 2/3 des patients (Perucca, Scheffer, and Kiley 2018). L'opération chirurgicale, consistant la résection du foyer épileptique, est alors la meilleure solution, mais seuls les patients souffrant de crises focales localisées peuvent y prétendre (West et al. 2019). Pour les patients non éligibles à la chirurgie ou ceux pour qui la chirurgie a échoué, les antiépileptiques alternatifs ou d'autres thérapies non pharmacologiques, telles que le régime cétogène et la neurostimulation, peuvent améliorer le contrôle des crises.

Tableau 1 : Liste des molécules antiépileptiques les plus communes.

	Stabilisateurs du potentiel de membrane		↘ neurotransmission		Potentialisation du GABA		Autres actions	
	Bloqueurs canaux Na ⁺	Activateurs des canaux K ⁺	Bloqueurs des canaux Ca ²⁺ (N, P/Q-type)	↘ libération des vésicules synaptiques	Agonistes des récepteurs GABAergiques	Inhibiteurs de la recapture et de la dégradation du GABA	Bloqueurs des canaux Ca ²⁺ (T-type)	Antagonistes des récepteurs NMDA
Benzodiazépines					++			
Carbamazépine	++							
Ethosuximide							++	
Felbamate					+			+
Gabapentine		+	++					
Lacosamide	++							
Lamotrigine	++		++					
Levetiracetam				++				
Oxcarbazépine	++	+						
Phénobital					++			
Phénytoïn, Fosphénytoïn	++							
Pregabalin			++					
Tiagabine						++		
Topiramate	++				++			
Valproate	+					+	+	+
Vigabatrin						++		
Zonisamide	++		++				++	

Outre les crises, l'épilepsie est associée à de nombreuses comorbidités, venant alourdir l'impact de la maladie, comme les troubles de l'anxiété, la dépression, les migraines, les démences, les troubles du spectre autistique, etc. (Błaszczuk and Czuczwar 2016; Gaitatzis, Sisodiya, and Sander 2012; Keezer, Sisodiya, and Sander 2016; Velioğlu, Boz, and Özmenoğlu 2005). Malheureusement, les personnes atteintes d'épilepsie souffrent encore de l'image

négative associée à cette maladie. Les crises d'épilepsie continuent de faire peur et peuvent être considérées comme une menace au travail, voire, même dans les relations humaines. Cette image peut alors amener à un manque de confiance en soi ainsi qu'à un sentiment d'insécurité en fonction de la sensibilité de la personne, de son style de vie et de son entourage. C'est pourquoi le suivi médical ne doit pas s'arrêter aux traitements médicamenteux contre les crises, mais doit s'accompagner d'un suivi psychologique pour apprendre à mieux vivre avec cette maladie (Villas, Meskis, and Goodliffe 2017; Wheless, Fulton, and Mudigoudar 2020).

1.2. Les épilepsies d'origine génétique

1.2.1. Le syndrome de Dravet

1.2.1.1. Qu'est-ce qu'un syndrome épileptique ?

Un syndrome épileptique est défini comme un groupe de symptômes cliniques aux caractéristiques bien définies qui surviennent épisodiquement et d'une manière spontanée. Ces caractéristiques comprennent : l'âge auquel survient la première crise, les potentiels facteurs déclenchant les crises (comme la fièvre), le type de crises (tonique, clonique ou absence), la ou les région(s) du cerveau concernée(s), l'évolution au cours du temps (aggravation ou rémission), les marqueurs génétiques, les enregistrements EEG ou l'imagerie cérébrale (IRM fonctionnelle) (Anon 1989). Cependant, cette classification des syndromes épileptiques est surtout un outil de diagnostic qui permet de déterminer la meilleure stratégie thérapeutique. On compte actuellement une vingtaine de syndromes épileptiques parmi lesquels : le syndrome de West, le syndrome de Lennox-Gastaut, le syndrome de Landau-Kleffner ou le syndrome de Dravet, sur lequel nous avons focalisé notre étude.

1.2.1.2. Historique : l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson

Le syndrome de Dravet est une épilepsie rare de l'enfant qui a été décrite pour la première fois en 1978 par Charlotte Dravet, comme une épilepsie myoclonique sévère du nourrisson qui se distingue du syndrome de Lennox-Gastaut (Dravet 1978). Au cours des années 80, plusieurs cas furent reportés en Europe ainsi qu'au Japon. Cependant, ces cas ne présentaient pas tous des myoclonies et montraient de nombreuses disparités au niveau des enregistrements EEG. Néanmoins, la maladie suivait la même progression et la même issue. Enfin, des études cliniques ont démontré que cette épilepsie ne s'arrêtait pas à l'enfance, mais qu'elle persistait au cours de l'adolescence ainsi qu'au début de la vie d'adulte. Pour ces

raisons, l'épilepsie myoclonique sévère du nourrisson a été reconnue comme un syndrome épileptique à part entière et fut renommée, à titre éponyme, syndrome de Dravet (Anon 1989). Suite à la classification des syndromes épileptiques par l'ILAE en 1898, le syndrome de Dravet est défini par des crises fébriles et non-fébriles, toniques et tonico-cloniques apparaissant dans la première année de vie et se développant en crises myocloniques, absences atypiques et d'autres crises focales. Un retard du développement commence à apparaître au cours de la deuxième année de vie suivi par des déficits cognitifs et des troubles comportementaux, souvent sévères (**Figure 2**).

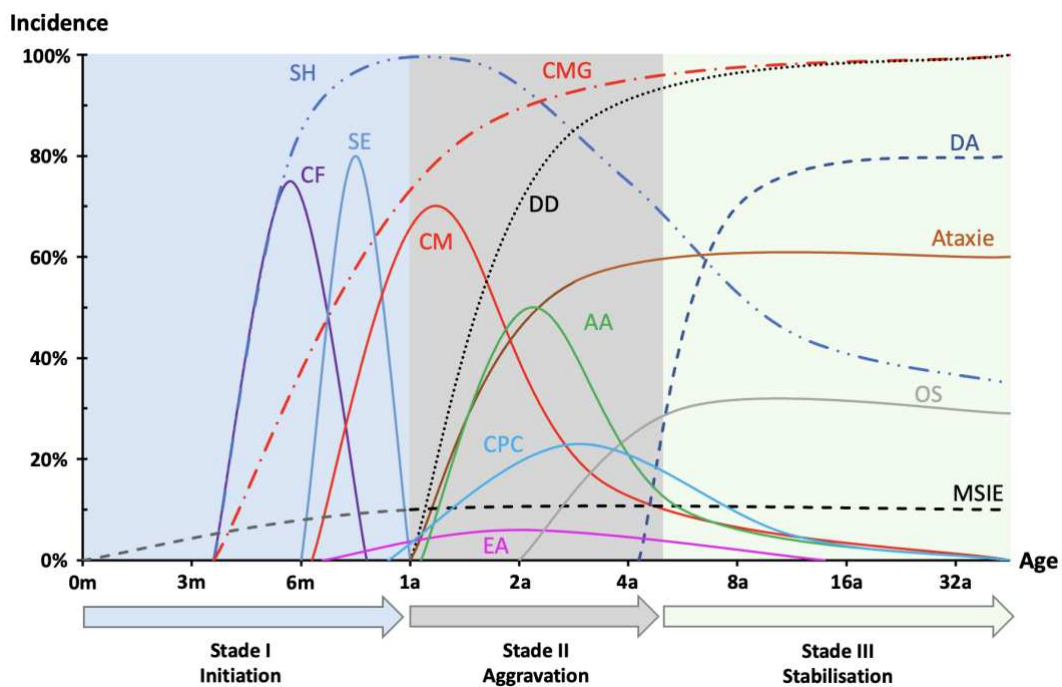


Figure 2 : Représentation schématique des manifestations cliniques du syndrome de Dravet et de leur incidence relative en fonction de l'âge. SH: sensibilité à l'hyperthermie; SE: Status epilepticus; CF: Crise fébrile; CMG: Crise moteur généralisée; CM: Crise myoclonique; AA: Absence atypique; CPC: crise partielle complexe; OS: obtundation status; EA: Encéphalopathie aiguë; DD: délai de développement; DA: démarche accroupie. Figure traduite et modifiée de Gataullina & Dulac, 2017.

Depuis le début des années 2000, après la découverte des mutations du gène *SCN1A* qui sont responsables de la majorité des cas, le syndrome de Dravet est considéré comme une canalopathie (Claes et al. 2001). De nos jours, le syndrome de Dravet a une prévalence comprise entre 1 naissance sur 20.000 et 1 naissance sur 40.000 selon les pays (Bayat, Hjalgrim, and Møller 2015; Rosander and Hallböök 2015; Wu et al. 2015). La très grande majorité des patients réagissent très peu voire pas du tout aux molécules antiépileptiques actuelles (**Figure 6**), même si de nouveaux traitements prometteurs sont en développement ou viennent d'être approuvés par la FDA (**Tableau 3**) (Wallace, Wirrell, and Kenney-Jung 2016; Wirrell and Nabbout 2019).

1.2.1.3. Les caractéristiques cliniques du syndrome de Dravet

Le syndrome de Dravet se déclenche au cours de la première année de vie, entre 5 et 8 mois. La première crise est souvent clonique, focale ou généralisée, et potentiellement déclenchée par une hyperthermie due à de la fièvre induite par une infection ou une vaccination, voire par un bain chaud. Cette crise est plus longue qu'une crise fébrile classique et peut durer jusqu'à 20 minutes. L'enregistrement EEG est souvent normal à cet âge, mais peut montrer des ralentissements diffus ou unilatérales, surtout après une longue crise. Cette crise initiale est suivie dans les semaines et les mois qui suivent par d'autres crises du même type. Après cette phase d'initiation de la maladie, commence une période d'aggravation avec l'augmentation de la fréquence des crises fébriles accompagnée de plus en plus de crises non-fébriles. Entre 1 et 4 ans, on constate l'apparition d'autres types de crises et, notamment, des crises cloniques ou tonico-cloniques généralisées, des crises myocloniques, des crises focales pouvant se généraliser et, plus rarement, des crises toniques. C'est aussi au cours de cette période, et plus particulièrement au cours de la deuxième année de vie, qu'apparaissent progressivement les retards de développement. Ainsi, les enfants commencent à parler entre 10 et 16 mois, mais à un rythme très lent et de nombreux patients n'arrivent jamais à construire des phrases complexes. Les enfants commencent à marcher vers 18 à 20 mois, mais développent une démarche instable, persistant pendant une longue durée. De plus, les patients peuvent souffrir d'hypotonie ainsi que d'ataxie, rendant leurs gestes peu sûrs et maladroits. Ces enfants souffrent aussi de troubles de l'attention et d'hyperactivité impactant leur capacité d'apprentissage. Certains patients peuvent montrer des troubles du spectre autistique en préférant des activités individuelles plutôt que collectives. Après 5 ans, la maladie semble se stabiliser, voire s'améliorer. En effet, on constate une quasi-disparition des crises myocloniques et des absences atypiques, ainsi qu'une diminution de la fréquence des crises cloniques ou tonico-cloniques et des crises focales, lesquelles surviennent préférentiellement durant le sommeil. De même, les troubles comportementaux semblent s'améliorer bien que les déficits cognitifs persistent. Mais il y a des exceptions et l'aggravation de la maladie peut toujours survenir après 5 ans (**Figure 2**) (Anwar et al. 2019; Dravet 2011).

De nos jours, le taux de mortalité chez les patients atteints du syndrome de Dravet est d'environ 10%. Cette mortalité est plus importante durant les premières années de vie et tend

à s'améliorer après la phrase d'aggravation de la maladie. En effet, 73% des décès surviennent avant l'âge de 10 ans et 93% avant l'âge de 20 ans. Ces décès sont dus, dans environ la moitié des cas, à une mort subite et inexpliquée en épilepsie (MSIE), et dans un tiers des cas, à un état de mal épileptique prolongé : *Status Epilepticus* (SE). De telles causes de décès sont généralement moins représentées dans les épilepsies et elles surviennent à des âges plus tardifs. Les taux importants de MSIE et de SE à un jeune âge représentent une caractéristique particulière du syndrome de Dravet qui peut s'expliquer par la sévérité de ce syndrome épileptique dont les crises atteignent leur paroxysme entre l'âge de 1 et 4 ans. Enfin, les autres causes de décès, représentant les 20 derniers pourcents, se partagent entre les accidents, les noyades, les infections et les causes "autres ou inconnues" (Shmuely et al. 2016).

1.2.2. Un syndrome causé par des mutations *de novo*

1.2.2.1. Les canaux sodiques voltage-dépendants

Les neurones sont des cellules du SNC permettant la transmission de signaux bioélectriques. Ces cellules sont capables de transformer les stimuli extérieurs en influx nerveux, puis de conduire cet influx pour le transmettre à d'autres cellules, neurones ou cellules musculaires. Ces capacités d'excitabilité et de conductivité sont dues à la différence de potentiel existant entre les milieux intra- et extracellulaire des cellules nerveuses. Cette différence de potentiel, comprise entre -50 et -55 mV au repos, est maintenue par des pompes sodium-potassium, lesquelles échangent 3 ions sodium intracellulaires contre 2 ions potassium extracellulaires suite à la consommation d'une molécule d'ATP, créant ainsi deux gradients de concentration. Suite à un stimulus, des canaux sodiques vont s'ouvrir, provoquant une augmentation brusque et localisée du potentiel de la membrane allant jusqu'à la dépolarisation de cette dernière, générant dès lors un influx nerveux appelé communément potentiel d'action. Celui-ci va se transmettre le long des fibres nerveuses, jusqu'au bout de l'axone et provoquer la libération des neurotransmetteurs. La fonction première des canaux sodiques voltage-dépendants est de conduire le potentiel d'action le long de l'axone en détectant les modifications locales du potentiel de la membrane et ainsi de provoquer l'influx brutal de sodium dans la matrice intracellulaire pour déplacer la dépolarisation locale de la membrane cellulaire. Ces canaux sont des hétérotrimères constitués d'une sous-unité α et de deux sous-unités β . Les sous-unités β sont des glycoprotéines à 1 segment transmembranaire permettant de stabiliser les sous-unités α et

de modifier le voltage d'ouverture du port ainsi que sa cinétique. La sous-unité α constitue le cœur du canal. Elle est composée de 4 domaines, eux-mêmes constitués de 6 segments transmembranaires, formant le port ionique et permettant la détection du potentiel membranaire, clé pour l'ouverture du canal (Catterall 2000) (**Figure 3**).

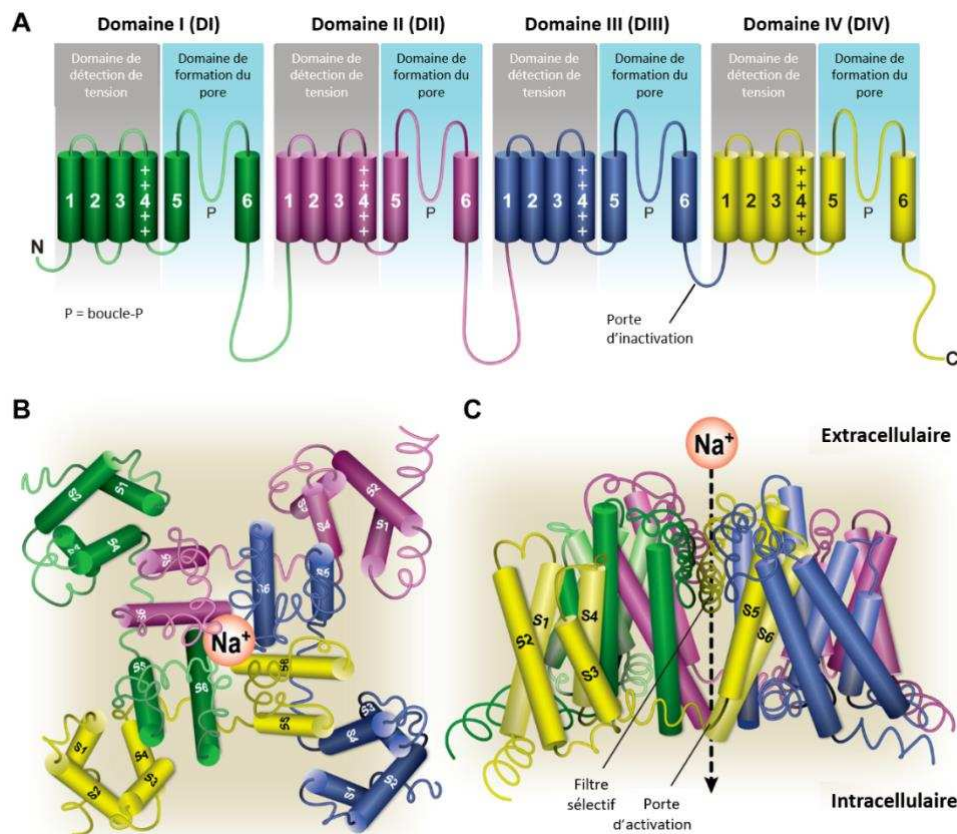


Figure 3 : Architecture des canaux $\text{Na}_v1.1$. (A) Topologie des sous-unités α du canal Na_v humain. Ces protéines sont constituées de quatre domaines homologues DI (vert), DII (rose), DIII (bleu) et DIV (jaune) reliés par des lieurs intracellulaires. Chaque domaine contient six segments hélicoïdaux transmembranaires (S1-6). Les segments S1-S4 forment le domaine de détection de tension. Les signes plus en S4 représentent le capteur de tension chargé positivement (contenant un certain nombre de résidus d'arginine ou de lysine). Le mouvement des segments S6 conduit à l'ouverture du canal en réponse à la dépolarisation de la membrane. Les segments S5, S6 et les boucles P de connexion forment le pore du canal. La boucle intracellulaire reliant DIIIS6 et DIVS1 fonctionne comme une porte d'inactivation, fermant le pore du canal lors d'une inactivation rapide. (B) Vue extracellulaire de la structure cristalline de la conformation ouverte du canal Na_v . (C) Vue latérale de la structure cristalline de la conformation ouverte du canal Na_v . Le filtre de sélectivité et la porte d'activation sont indiqués respectivement au centre et dans la partie intracellulaire du canal. Figure traduite de De Lera Ruiz & Kraus, 2015.

Chez les mammifères, il existe neuf sous-unités α fonctionnelles nommées $\text{Na}_v1.1$ à $\text{Na}_v1.9$ et codées respectivement par les gènes *SCN1A* à *SCN5A* et *SCN8A* à *SCN11A*, avec une particularité pour les gènes *SCN6A* et *SCN7A* qui coderaient pour des canaux sodiques non-voltage-dépendants (**Tableau 2**). Leur cinétique de fonctionnement est légèrement différente et leur expression est tissu-spécifique. Dès lors, les sous-unités principalement exprimées dans le SNC sont les sous-unités $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ et $\text{Na}_v1.6$, la sous-unité $\text{Na}_v1.4$ est plutôt

exprimée dans les muscles squelettiques, les canaux $\text{Na}_v1.5$ au niveau du cœur, $\text{Na}_v1.7$ par les neurones du SNP et les sous-unités $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ se retrouvent dans les neurones du ganglion spinal (Catterall 2012).

Tableau 2 : Corrélation des gènes codant les différentes sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants chez l'Homme et le poisson zèbre. Tableau adapté de Novak et al. 2006.

Sous-unité α	Gène humain	Gène poisson zèbre	Expression
$\text{Na}_v1.1$	<i>SCN1A</i>	<i>scn1Laa / scn1Lab</i>	Neurones du CNS et muscles cardiaques
$\text{Na}_v1.2$	<i>SCN2A</i>	<i>scn1Laa / scn1Lab</i>	Neurones du CNS et du PNS
$\text{Na}_v1.3$	<i>SCN3A</i>	<i>scn1Laa / scn1Lab</i>	Neurones du CNS et muscles cardiaques
$\text{Na}_v1.4$	<i>SCN4A</i>	<i>scn4aa / scn4ab</i>	Muscles squelettiques
$\text{Na}_v1.5$	<i>SCN5A</i>	<i>scn5Laa / scn5Lab</i>	Muscles squelettiques, neurones du CNS, muscles lisse-gastrointestinaux
$\text{Na}_v1.6$	<i>SCN8A</i>	<i>scn8aa / scn8ab</i>	Neurones du CNS, cellules gliales
$\text{Na}_v1.7$	<i>SCN9A</i>	<i>scn1Laa / scn1Lab</i>	Neurones du PNS, cellules de Schwann
$\text{Na}_v1.8$	<i>SCN10A</i>	<i>scn5Laa / scn5Lab</i>	Neurones du ganglion de la racine dorsale
$\text{Na}_v1.9$	<i>SCN11A</i>	<i>scn5Laa / scn5Lab</i>	Neurones du ganglion de la racine dorsale
Na_x	<i>SCN6A</i> <i>SCN7A</i>		Muscles cardiaques et utérins, muscles squelettiques, astrocytes

Chez le poisson zèbre, la famille des sous-unités α des canaux sodiques voltage-dépendants est constituée de 4 gènes dupliqués : *scn1Laa* et *scn1Lab*, *scn4aa* et *scn4ab*, *scn5Laa* et *scn5Lab*, et *scn8aa* et *scn8ab* (Tableau 2). Les gènes *scn1Laa* et *scn1Lab* sont homologues aux gènes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* et *SCN9A*, et ils sont exclusivement exprimés dans le système nerveux. *Scn1Laa* qui est exclusivement exprimé dans le SNP, a une expression proche de celle de *SCN9A*. À l'inverse, l'expression de *scn1Lab* se rapproche plus de celle des gènes *SCN1A*, *SCN2A* et *SCN3A*, car il est exclusivement exprimé au sein du SNC. Les gènes *scn4aa* et *scn4ab* qui sont les orthologues du gène *SCN4A*, sont majoritairement exprimés par les muscles squelettiques. *Scn5Laa* et *scn5Lab* sont exprimés au niveau du cœur et sont phylogénétiquement reliés aux gènes *SCN5A*, *SCN10A* et *SCN11A*. Enfin, les gènes *scn8aa* et *scn8ab* sont les orthologues du gène *SCN8A*. Dès lors, tous les gènes exprimés chez l'humain possèdent un orthologue chez le poisson zèbre (Novak, Jost, et al. 2006; Novak, Taylor, et al. 2006).

1.2.2.2. Les mutations du gène *SCN1A*

Au début des années 2000, des chercheurs belges ont étudié le gène *SCN1A* chez 7 patients atteint du syndrome de Dravet et ont trouvé une mutation hétérozygote de ce gène chez chacun des patients, mais qui étaient absentes chez les deux parents de ces patients. Ces chercheurs ont donc conclu que des mutations *de novo* du gène *SCN1A* sont à l'origine du syndrome de Dravet (Claes et al. 2001). Depuis, plus de 1000 mutations du gène *SCN1A* ont

été identifiées, 40% conduisant à une protéine tronquée, 40% sont des mutations faux-sens plutôt localisées au sein des segments transmembranaires qui empêchent un fonctionnement normale du canal, les 20% restant causent des problèmes d'épissage de l'ARN (**Figure 4**) (Catterall, Kalume, and Oakley 2010; Marini et al. 2011). Ces mutations hétérozygotes mènent à une haplo-insuffisance de la sous-unité $Na_v1.1$. Il pourrait sembler paradoxale que la perte de fonction de canaux sodiques responsables de la transmission du potentiel d'action le long des axones, et donc du fonctionnement primaire des neurones, cause des crises d'épilepsie caractérisées par une hyperexcitabilité neuronale. Néanmoins, des études chez la souris ont montré que la sous-unité $Na_v1.1$ des canaux sodiques voltage-dépendants était préférentiellement exprimée dans les interneurones GABAergiques où elle est responsable de la grande majorité des courants électriques inhibiteurs, expliquant dès lors l'apparition de crises d'épilepsies après l'inactivation partielle de ces canaux (Ogiwara et al. 2007; Yu et al. 2006). Effet, les mutations *de novo* du gène *SCN1A* induisent une perte de fonction de la sous-unité $Na_v1.1$ des canaux sodiques, conduisant à une diminution de l'activité des neurones GABAergiques qui n'arrivent plus à contrebalancer les signaux excitateurs, provoquant ainsi un défaut de la balance excitation/inhibition et l'apparition de crises d'épilepsie (Mathews 2007).

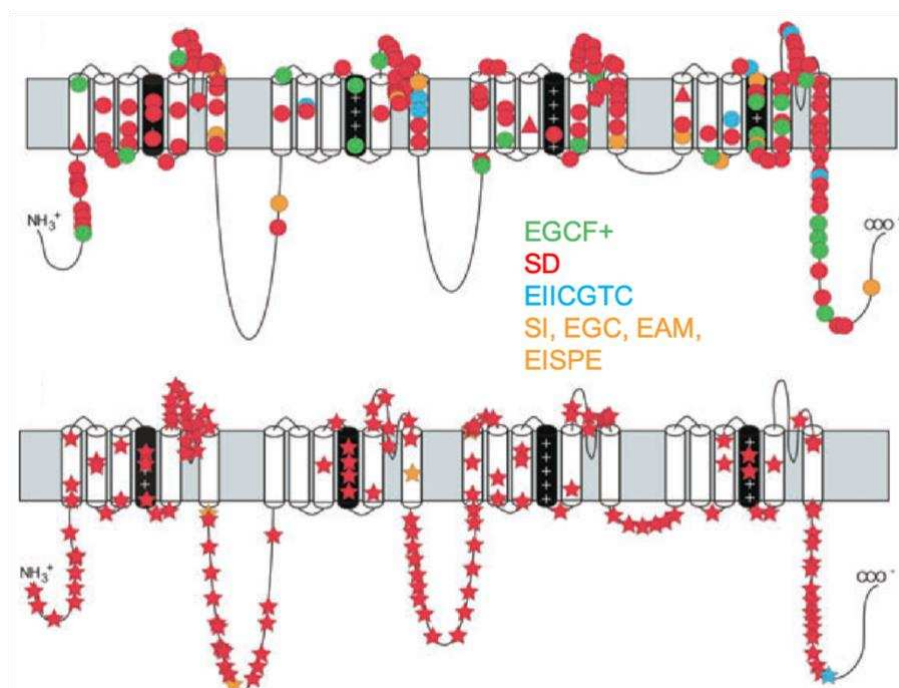


Figure 4 : Localisation et type de mutations du canal $Na_v1.1$ chez les patients atteints d'épilepsie. Type de mutations: Cercle: mutation faux-sens; triangle: substitution; étoile: troncature. Type d'épilepsie clinique : Épilepsie Généralisée avec Convulsions Fébriles plus (EGCF+), Syndrome de Dravet (SD), Épilepsie Idiopathique Infantile avec Crises Généralisées Tónico-Cloniques (EIICGTC), Spasmes Infantile (SI), Épilepsie

Généralisée Cryptogénique (EGC), Épilepsie Asiatique Myoclonique (EAM), Épilepsie Idiopathique Sévère de la Petite Enfance (EISPE). Figure traduite et modifiée de Catterall et al. 2010.

Les mutations du gène *SCN1A* sont responsables de la grande majorité des syndromes de Dravet : entre 70 et 80% des cas. Mais il ne s'agit pas du seul gène dont la mutation peut provoquer cette maladie (**Figure 5**). En effet, des mutations d'autres gènes codant d'autres sous-unités des canaux sodiques voltage-dépendants peuvent conduire à l'apparition de ce syndrome : *SCN2A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN1B*. De même, les mutations des gènes *GABRA1* et *GABRG2*, codant des sous-unités du récepteur GABA_A; celles des gènes *HCN1* et *KCNA2*, importants pour le fonctionnement des canaux potassiques; et des gènes *STXBP1*, *CHD2* et *PCDH19* (exclusivement chez les femmes), peuvent induire le syndrome de Dravet (Steel et al. 2017).

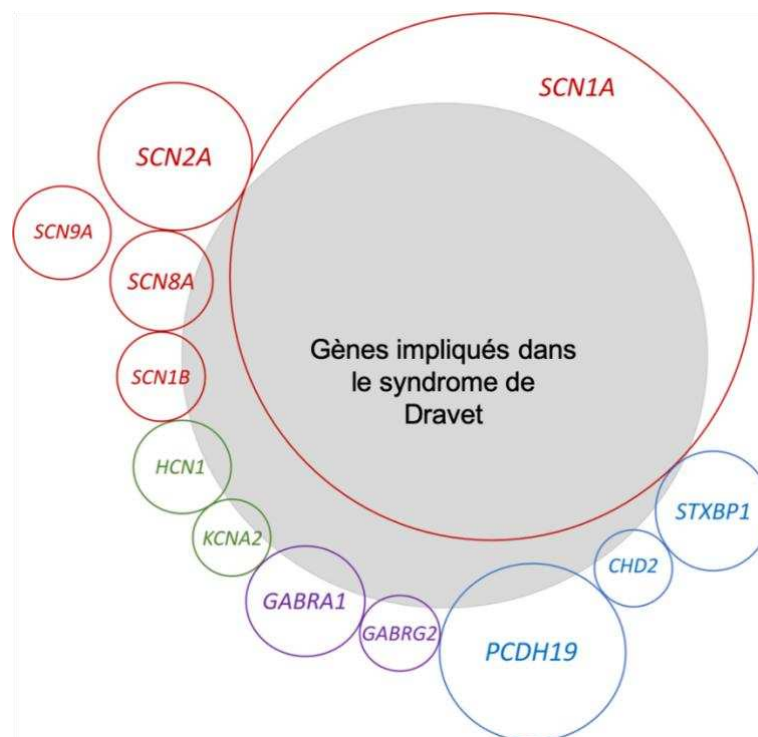


Figure 5 : Proportion des gènes associés à un phénotype du syndrome de Dravet. Rouges: canaux sodiques; Vert: canaux potassiques; Violet: canaux chlorures; Bleu: autre. Figure traduite de (Steel et al. 2017).

1.2.3. Les traitements

1.2.3.1. La stratégie thérapeutique

Comme indiqué précédemment, le syndrome de Dravet est une épilepsie de l'enfant qui est pharmaco résistante. En effet, les molécules antiépileptiques courantes n'ont que peu d'effet sur l'incidence des crises. Certaines de ces molécules peuvent même avoir l'effet contraire à celui espéré, en exacerbant les crises d'épilepsie, comme c'est le cas des inhibiteurs de canaux sodiques: carbémazépine, phénytoïne, vigabatrine, oxcarbazépine

(Guerrini et al. 1998; Saito et al. 2001; Snoeijen-Schouwenaars et al. 2015). Actuellement, la stratégie thérapeutique dépend du stade de la maladie et donc de l'âge du patient. Au cours des deux premières années de vie, le *Status Epilepticus* est le risque le plus important. Entre 2 et 10 ans, des crises non-convulsives fréquentes peuvent être à l'origine de retards de développement importants. Enfin, au cours de l'adolescence, les crises tonico-cloniques qui ont lieu préférentiellement la nuit, sont la principale cause de MSIE. Dès lors, la stratégie thérapeutique repose en grande partie sur la diminution de la fréquence des crises tout en limitant les effets secondaires causés par les traitements utilisés (**Figure 6**) (Knupp and Wirrell 2018). Dans un premier temps, il est recommandé d'éviter les sources de déclenchement des crises telles que l'hyperthermie et, plus rarement, la photosensibilité. Ensuite, l'acide valproïque et le clobazam constituent les molécules antiépileptiques de première intention. L'acide valproïque est un anticonvulsivant à large spectre possédant plusieurs voies d'action possibles dont l'augmentation de la synthèse de GABA et l'inhibition des canaux sodiques (Tomson, Battino, and Perucca 2016). De son côté, le clobazam est une molécule de la famille des benzodiazépines, un agoniste des récepteurs GABAergiques (Pernea and Sutcliffe 2016). Malheureusement, ces molécules ne permettent, dans la majorité des cas, qu'une faible réduction de la fréquence des crises et doivent être accompagnées d'une molécule de deuxième intention, tel que le stiripentol ou le topiramate. Le stiripentol est un modulateur allostérique des récepteurs GABA_A utilisé en Europe, au Japon, au Canada et sous certaines conditions aux États-Unis (Chiron 2019). Le topiramate, quant à lui, est un inhibiteur de l'anhydrase carbonique capable d'augmenter l'activité GABAergique, d'inhiber les récepteurs AMPA et kainate, et de bloquer les canaux calciques et sodiques (Kröll-Seger et al. 2006). En plus des molécules précédentes, il peut être recommandé de suivre un régime cétogène. Il s'agit d'un régime pauvre en glucides et riche en lipides. C'est une méthode efficace pour lutter contre les crises dans le cadre des patients réfractaires aux molécules antiépileptiques qui est connue depuis de nombreuses années, même si son mode d'action reste en grande partie inconnu (Laux and Blackford 2013; Wang et al. 2020). En cas d'échec ou d'impact trop faible des traitements précédents, il est possible d'utiliser le levetiracetam, les sels de bromure, le zonisamide ou l'éthosuximide, bien qu'il y ait peu de données sur leur efficacité ainsi que sur leur(s) mode(s) d'action (Knupp and Wirrell 2018). En plus de ces molécules, il est possible d'envisager des procédures chirurgicales telles que la stimulation du nerf vagal ou une callosotomie (Dibué-Adjei et al. 2017; Fulton et al. 2017). Mais, là encore, les données sur

l'efficacité de telles procédures sont très peu nombreuses, surtout dans le cas de la callosotomie (Wirrell et al. 2017).



Figure 6 : Stratégie thérapeutique dans le syndrome de Dravet. La stratégie thérapeutique dans le syndrome de Dravet se répartie en trois phase. Une première au cours de laquelle sont administré du VPA et/ou du CLB. En cas de non-contrôle des crises, ces molécules peuvent s'accompagner de TPM ou de STP, constituant les molécules de deuxième intention. Si la fréquence de crises ne diminue pas, un régime cétogène peut alors être instauré. Le STP et le TPM peuvent ensuite être remplacés par des Bromures, du LEV, de l'ESX ou du ZNS. Enfin, en cas d'échec de toutes ces molécules, il est possible de se tourner vers des traitements expérimentaux. VPA: Acide Valproïque; CLB: Clobazam; TPM: Topiramate; STP: Stiripentol; LEV: Levetiracetam; ESX: Éthosuximide; ZNS: zonisamide. Figure adaptée de Gataullina & Dulac, 2017.

1.2.3.2. Les molécules en développement

Face au manque de traitements utilisables et à leur efficacité relative, un contrôle adéquat des crises reste compliqué dans le cadre du syndrome de Dravet. C'est pourquoi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que le développement de nouvelles molécules sont essentielles pour les thérapies futures (**Tableau 2**) (Wirrell and Nabbout 2019). Les dérivés du cannabis ont été au centre de l'attention ces dernières années pour leur possible utilisation contre les crises d'épilepsie (Devinsky et al. 2017, 2018). En effet, de nombreuses études ont montré les effets bénéfiques du cannabidiol dans le syndrome de Dravet, réduction de la fréquences des crise d'environ 40%, ce qui a amené à son autorisation de mise sur le marché par le FDA en juin 2018 ([fda.gov](https://www.fda.gov)) puis par l'union européenne en septembre 2019 (ansm.sante.fr). D'autres molécules ciblant les récepteurs sérotoninergiques sont en cours de développement. Notamment le fenfluramine, un dérivé de l'amphétamine, agoniste des récepteurs 5-HT de type 2A, 2B et 2C, et précédemment utilisé pour perdre du poids. Les études cliniques ont montré une réduction de 50% de la fréquence des crises chez plus de 70% des patients (Lagae et al. 2019). Des essais sont toujours en cours mais l'Agence Nationale de sécurité du médicament a délivré fin 2020 une autorisation temporaire d'utilisation du fenfluramine pour les patients Dravet de plus de 2 ans en échec thérapeutique

(ansm.sante.fr). Parmi les agonistes spécifiques des récepteurs sérotoninergiques, Il existe aussi la lorcaserin, là aussi précédemment utilisée contre la prise de poids, et qui est actuellement en phase III d'essai clinique (Tolete et al. 2018). Le clémizole est un antihistaminique de première génération pouvant aussi être un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A} et 2B. Les propriétés anticonvulsives de cette molécule ont été découvertes suite à un criblage à grande échelle de molécules candidates en utilisant un modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre (Griffin et al. 2017). Cette molécule vient juste d'entrer en phase clinique et les premières conclusions sont attendues pour fin 2021 (ichgcp.net). D'autres molécules, comme le trazodone, l'ataluren, le verapamil, le TAK-935 ainsi que le BIS-001 (Knupp and Wirrell 2018), sont en phase d'essais cliniques ou vont bientôt y entrer dans l'espoir d'établir de nouvelles solutions thérapeutiques pour les patients atteints du syndrome de Dravet.

Tableau 3 : Liste des molécules en développement et en tests cliniques pour le syndrome de Dravet

Molécule	Mécanisme d'action potentiel	Phase clinique	Efficacité	Référence(s)
Cannabidiol	Agoniste des récepteurs 5-HT _{1A} , antagoniste de GPR55, modulateur du calcium intracellulaire	Autorisé	Diminution des crises dans 43% des cas	(Devinsky et al. 2017, 2018)
Fenfluramine	Agoniste des récepteurs 5-HT de type 2A, 2B et 2C	Fin de phase III Pré-disponible	Diminution des crises dans 70% des cas	(Ceulemans et al. 2012; Lagae et al. 2019)
Lorcaserin	Agoniste spécifiques du récepteur 5-HT _{2C}	III	Diminution des crises dans 47% des cas (17/35)	(Tolete et al. 2018)
Clemizole	Antihistaminique de première génération	II		(Griffin et al. 2017)
Verapamil	Bloqueur des canaux calciques voltage dépendants	II		(Nicita et al. 2014)
Ataluren	Interagit avec les ribosomes	II		(Devinsky et al. 2021)
TAK-935	Inhibiteur sélectif de la cholestérol 24-hydroxylase	II		
Trazodone	Modulation de la sérotonine	Préclinique		(Azevedo Kauppila et al. 2018)
BIS-001	Inhibiteur des cholinestérases issus de la médecine traditionnelle chinoises	Préclinique		(Wong et al. 2016)

1.2.3.3. La gestion des comorbidités

Les crises d'épilepsie sont le symptôme principal du syndrome de Dravet, mais elles ne représentent qu'une facette de la maladie dont il ne faut pas oublier les nombreuses comorbidités (**Figure 7**). Lorsque les enfants atteints de DS vieillissent, les crises ont tendance à s'améliorer mais le déclin des fonctions cognitives et les dysfonctionnements comportementaux demeurent; la plupart des adolescents atteints de DS dépendent des aidants naturels et ont besoin de soins à vie. En effet, en plus des crises et des troubles cognitifs, les patients peuvent développer des déficits moteurs, tels qu'une ataxie, une

dysarthrie ou des symptômes parkinsoniens; des problèmes comportementaux, comme des troubles du spectre autistique ou des troubles du déficit de l'attention, avec ou sans hyperactivité; ainsi que des difficultés à trouver et à maintenir le sommeil (Villas et al. 2017). On pense que ces comorbidités sont une conséquence directe de la perte de fonction des canaux sodiques et non une conséquence des crises, même si ces dernières peuvent, en cas de forte incidence pendant le développement, accentuer ces comorbidités. Dès lors, un suivi multidisciplinaire est essentiel pour le bien-être des patients et peut se composer de séances de kinésithérapie, d'orthophonie, de thérapies comportementales et de suivis psychologiques (Ziobro et al. 2018).



Figure 7 : Comorbidités dans le syndrome de Dravet. Le syndrome de Dravet est une maladie complexe possédant de nombreuses comorbidités réparties entre la santé mentale, les déficits cognitifs, les troubles neurologiques et moteurs.

1.3. Les épilepsies d'origine environnementales

1.3.1. Les organophosphorés

1.3.1.1. Propriétés

La plupart des organophosphorés (OPs) sont des molécules chimiques toxiques utilisées majoritairement comme pesticides ou comme agents de guerre (gaz Sarin, Soman, VX), mais

aussi dans les plastifiants, les retardateurs de flamme, les lubrifiants, etc. Leur structure chimique est centrée sur un atome de phosphore pentavalent doublement lié un atome d'oxygène ou, plus rarement, de soufre. Cet atome de phosphore peut ensuite être substitué directement par des groupes aryle ou alkyle, ou lié par un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote, mais aussi par un halogène, le plus souvent un atome de fluor (**Figure 8**) (Aldridge 1981). Du fait de ce large éventail de substituants possibles, les OPs possèdent des propriétés physico-chimiques très diverses. De ces propriétés dépendent leur mode de propagation (par voie gazeuse, par micro gouttelettes en suspension dans l'air, etc.), leur mode d'absorption (inhalation, ingestion, cutanée, etc.) et leur toxicité (Costanzi, Machado, and Mitchell 2018).

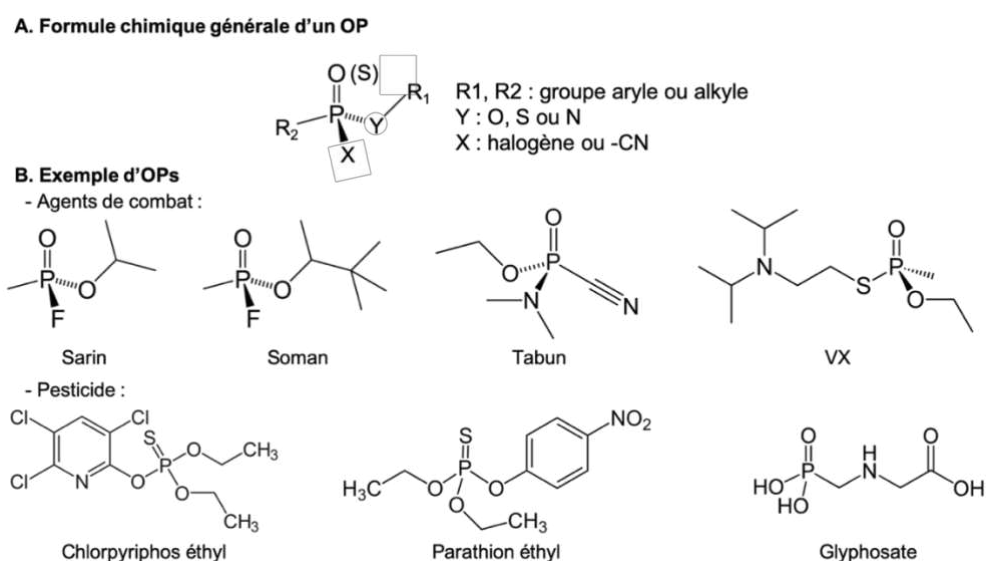


Figure 8 : Structures des OPs. (A) Structure générale des OPs. (B) Exemple d'OPs utilisés comme agents de guerre ou pesticides.

1.3.1.2. Utilisations historiques

Deux français, Jean Louis Lassange et Philippe de Clermont, figurent parmi les premiers scientifiques à avoir étudié des gaz neurotoxiques à base d'OPs. Au début des années 30, le scientifique allemand Willy Lange décrit pour la première fois le syndrome toxique associé à l'exposition à ces gaz, comme une sensation d'étouffement et une diminution de la vision. Ce sont les premiers symptômes cholinergiques d'une exposition du système nerveux aux OPs. Des expériences ont ensuite été menées par Gerhard Schrader dans le but de transposer l'utilisation de ces substances comme insecticides. Peu de temps après, le régime Nazi comprit l'utilisation potentielle de ces produits chimiques comme armes de guerre. Ils s'emparèrent alors de ces découvertes et ainsi fut développée la série G des gaz neurotoxiques (Sarin, Tabun et Soman). Les Nazis produisirent ces composés, surtout le sarin plus mortel, en très grande

quantité durant la seconde guerre mondiale, mais ne les ont jamais utilisés sur les troupes alliées. En réponse à cette découverte, les anglais développèrent la série V de ces agents, encore plus mortelle, et contenant notamment le VX (Ehrich 2005). Le développement des OPs comme agents de guerre a continué durant la guerre froide jusqu'à leur utilisation pendant le conflit Iran-Irak, dans les années 80, avec l'attaque de la ville kurde d'Halabia (plus de 5.000 morts et environ 7.000 blessés), les deux attentats au gaz sarin dans le métro de Tokyo en 1994 et 1995 (13 morts et 6.300 blessés), au cours de la guerre civile en Syrie de 2011 à nos jours, ou encore lors de l'assassinat du Nord-Coréen Kim Jong-Nam en 2017 et les tentatives d'assassinat visant l'agent double Sergueï Skripal et celle, plus récente, d'Alexandre Navalny (Jiří 2017; John et al. 2018; Tanimoto et al. 2017; Vale, Marrs, and Rice 2016).

L'utilisation de ces agents comme pesticides a aussi conduit à la contamination de la nature environnante : la faune, la flore mais aussi les sols. En effet, les OPs interagissent avec les minéraux présents dans les terres, conduisant dès lors à une bioaccumulation et donc une biodisponibilité pour les futures cultures (Kaushal, Khatri, and Arya 2021; Sidhu et al. 2019; Soares et al. 2019; Williams et al. 2014). De plus, les OPs restent stables au sein des cultures à des niveaux importants et peuvent ainsi empoisonner les consommateurs (Azlan et al. 2020; Sharma et al. 2010). C'est pourquoi l'Union Européenne a interdit l'usage en agriculture de certains OPs, tel que le Chlorpyrifos, et continue d'en interdire malgré les pressions des industries chimiques (Glyphosate – Monsanto). Enfin l'épandage de ces molécules reste un risque de contamination directe pour les agriculteurs ainsi que pour les populations vivant à proximité des cultures (Mew et al. 2017). Malheureusement, les OPs restent largement utilisés dans l'agriculture en Asie, notamment en Chine et en Inde, pour lutter contre les invasions d'insectes ravageurs.

1.3.2. La toxicité des organophosphorés

1.3.2.1. Les synapses cholinergiques : rôle et fonctionnement

L'acétylcholine (Ach) est une molécule qui est synthétisée au niveau de l'axone de certains neurones à partir de la choline et de l'acétyl-CoA. L'Ach est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques au sein du SNP et du SNC (Brown 2019). Son action est transmise par l'activation de deux types de récepteurs :

- Les récepteurs nicotiques sont des récepteurs ionotropiques perméables aux ions sodium et potassium. Il existe deux sous-types de ce récepteur. L'un est exprimé au

niveau des jonctions neuromusculaires et dont l'activation entraîne la contraction des fibres musculaires. L'autre, aussi perméable aux ions calcium, est exprimé exclusivement au sein du SNC, aux niveaux pré- et post-synaptique. Il est impliqué dans le système de récompense, la motivation et l'attention (Hurst, Rollema, and Bertrand 2013).

- Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, G_q ou G_i , selon le sous-type. Ils sont exprimés à la fois dans le SNP et le SNC. Ils régulent le rythme cardiaque, jouent un rôle important dans la motilité gastrique, permettent la contraction musculaire (vasodilatation), activent les glandes lacrymales et salivaires, et sont impliqués dans les mécanismes de la mémoire (Kameyama and Haga 1990).

Après avoir activé ces différents récepteurs, l'Ach est rapidement hydrolysée au sein de la fente synaptique par l'acétylcholinestérase (AChE) en acide acétique et en choline, qui est alors recapturée par les neurones afin d'être réutilisée dans la synthèse de nouvelles molécules d'Ach (**Figure 9**).

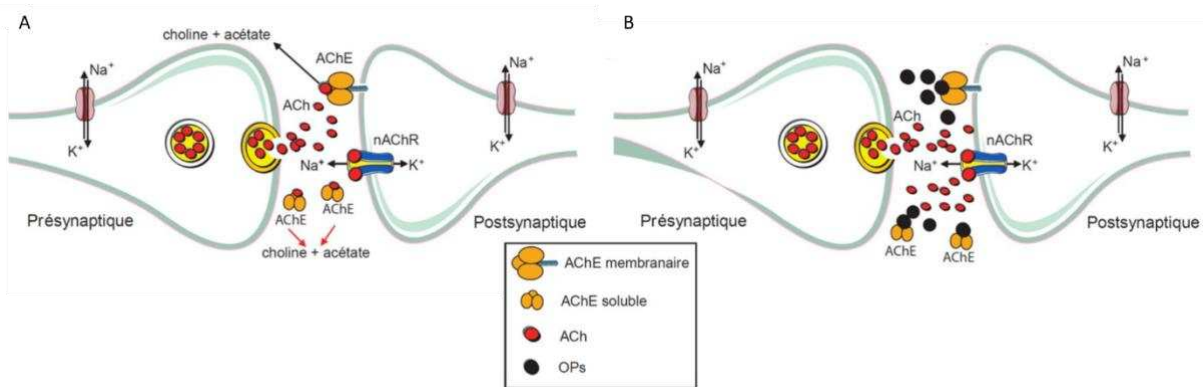


Figure 9 : Schéma du fonctionnement d'une synapse cholinergique en absence et en présence d'OP. (A) Fonctionnement physiologique d'une synapse cholinergique. L'Ach est synthétisée dans les fibres nerveuses à partir de choline et d'acétyl-CoA, puis stockées dans des vésicules. A l'arrivée d'un potentiel d'action, ces vésicules fusionnent avec la membrane neuronale et libèrent l'Ach dans la fente synaptique, où l'Ach active les récepteurs cholinergiques post-synaptiques. Après son action, l'Ach est dégradé par l'AchE en acétyl et en choline, ce qui régule la transmission synaptique. (B) En présence d'OP, l'AchE n'est plus capable d'hydrolyser l'Ach, ce qui provoque une suraccumulation de l'Ach dans la fente synaptique et donc une surstimulation des récepteurs post-synaptiques.

1.3.2.2. L'inhibition de l'AChE par les OPs et les symptômes induits

Les OPs sont des inhibiteurs de l'AChE. En effet, établissent par leur atome de phosphore des liaisons covalentes avec le résidu sérine présent au sein du site catalytique de l'enzyme et bloquent ainsi la dégradation de l'Ach, ce qui provoque son accumulation dans la fente synaptique et la sur-activation des récepteurs cholinergiques (**Figure 9**, **Figure 10**). Il est à

souligner que les OPs peuvent continuer de se métaboliser après leur liaison covalente avec le résidu sérine et ainsi former un complexe AchE-OP dit « vieilli » lequel est plus stable et surtout, empêche dès lors toute réactivation potentielle de l'enzyme (**Figure 10**) (Costanzi et al. 2018).

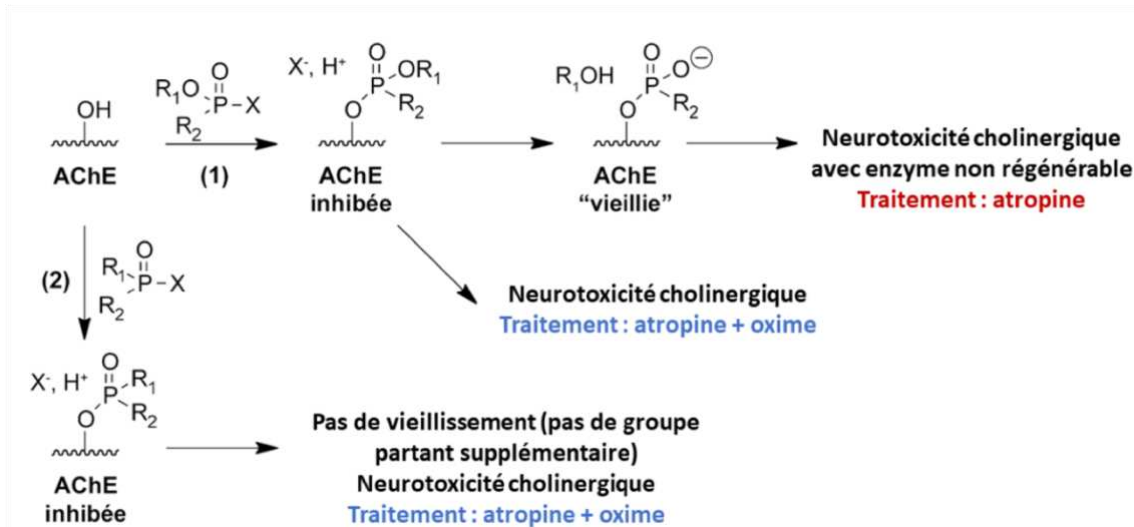


Figure 10 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par les OPs et potentiel traitements. Ce mécanisme représente l'AChE par une ligne ondulée avec le résidu hydroxyle de la sérine. L'OP va tout d'abord réagir avec ce résidu, en le phosphorylant, et ainsi créer une liaison covalente avec l'AChE. Cette association mène au blocage du site de fixation de l'Ach, empêchant son hydrolyse et provoquant les symptômes de l'empoisonnement. Néanmoins, à cette étape, l'association OP-AChE peut être rompue en utilisant des oximes. De plus, les symptômes peuvent être traités avec de l'atropine. Cependant, certains OPs peuvent continuer de se transformer une fois liés à l'AChE. En effet, certains OPs peuvent être hydrolysés une deuxième fois, ce qui conduit à l'apparition d'un atome d'oxygène chargé négativement, provoquant la stabilisation du complexe OP-AChE. Dans cette configuration, l'enzyme ne peut plus être régénérée par les oximes et seul l'atropine permet de diminuer les symptômes. Figure traduite et modifiée de Richardson et Makhaeva, 2014.

Comme présenté dans le paragraphe précédent, l'Ach est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. Dès lors, un empoisonnement par les OPs provoque un large éventail de symptômes. Dans la phase aiguë, on observe une atteinte du SNC caractérisée par une sur-salivation, sudation, diarrhée, urination, bradycardie, crampes et des troubles respiratoires (bronchorrhée avec paralysie des muscles intercostaux et du diaphragme) pouvant conduire au coma et au décès. Dans un second temps, apparaissent des symptômes neurologiques caractérisés par des troubles du comportement, une ataxie et des crises d'épilepsies qui, si elles ne sont pas traitées rapidement, peuvent entraîner un état de mal épileptique et la mort (Vale and Lotti 2015).

1.3.3. Les contrepoisons et les traitements actuels

La stratégie thérapeutique dépend en premier lieu du degré d'empoisonnement qui est divisé en 4 grades : grade 1 – sévérité faible, grade 2 – sévérité moyenne, grade 3 – sévérité

élevée et grade 4 – fatale. Notons que cette gradation a été établie à partir d'études épidémiologiques de personnes intoxiquées avec des OPs pesticides (Sam et al. 2009). Le traitement recommandé pour les cas sévères consiste à injecter un mélange composé d'atropine et d'une oxime. L'atropine est un antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques. Étant en compétition avec l'Ach, il permet de réduire la sur-activation des récepteurs muscariniques induite par l'accumulation de l'Ach dans la fente synaptique. Cependant, l'atropine n'a pas d'effet sur les récepteurs nicotiques responsables de la défaillance respiratoire souvent fatale. De plus, il s'agit d'un traitement purement symptomatique et non curatif. Le Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques de 1989 recommande pour les empoisonnements aux OPs : une injection initiale de 0,05 mg/kg d'en intraveineuse (IV) sur 3 min, qui doit être répétée toutes les 5 à 10 min. Le deuxième constituant de ce mélange, une molécule de la famille des oximes, est capable d'hydrolyser la liaison Oxygène-Phosphore entre le résidu Sérine de l'AchE et l'OP, régénérant ainsi l'activité de l'enzyme. Les oximes ont dès lors un rôle curatif. Toutefois, les oximes ne sont pas efficaces sur les complexes AchE-OP « vieillis ». De nombreuses oximes ont été développées depuis les années 90 et leur efficacité dépend de l'OP avec lequel le patient a été en contact. Ainsi, le 2-PAM est efficace en cas d'intoxication au sarin ou au VX, le HI-6 est la seule oxime efficace contre le soman, et l'OBX est un bon réactivateur en cas d'empoisonnement au tabun. Malheureusement, il n'existe pas de consensus international sur la meilleure oxime à utiliser ni même sur les doses à injecter. En France, l'oxime de référence est le 2-PAM, la première à avoir été synthétisée. En plus de l'atropine et d'une oxime, on peut aussi administrer des benzodiazépines aux personnes intoxiquées afin de réduire les crises épileptiformes induites par l'empoisonnement aux OPs. Ainsi, l'OMS recommande une injection en IV de 5 à 10 mg de diazépam sur 3 min, et qui peut être renouvelée toutes les 10 à 15 min (Eddleston et al. 2008; Hulse et al. 2019; Singh and Sharma 2000).

2. Les cellules microgliales : actrices dans les épilepsies

2.1. Qu'est-ce que la microglie ?

On sait que le cerveau n'est pas uniquement composé de neurones, ces derniers sont en effet accompagnés de cellules gliales lesquelles aident à leur bon fonctionnement et représenteraient entre 10% et 50% des cellules du SNC (von Bartheld, Bahney, and Herculano-

Houzel 2016). On attribue la découverte de ces cellules à Rudolf Virchow, lequel fut le premier, en 1856, à proposer le terme « neuroglia », pour décrire les cellules permettant le maintien des neurones ensemble. Les astrocytes furent les premières cellules gliales à être identifiées par leur morphologie en forme d'étoile. Il faudra ensuite attendre près d'un demi-siècle pour que la première mention des oligodendrocytes n'apparaisse (Boullerne 2016). Et ce n'est que 20 ans après que Rio-Hortega améliora la technique de coloration à l'argent de Golgi afin d'observer les cellules constituant « le troisième élément » du système nerveux central. Cet ancien élève de Santiago Ramón y Cajal distingua alors les oligodendrocytes d'un autre type de cellules gliales. Il fut le premier à proposer que la fonction principale des oligodendrocytes était d'entourer les fibres nerveuses d'une couche complexe de lipides et de protéines, la myéline, pour permettre une meilleure conduction des signaux électriques (Pérez-Cerdá, Sánchez-Gómez, and Matute 2015). De plus, ce sont ses observations plus approfondies qui ont permis la découverte de la dernière catégorie principale des cellules gliales : la microglie (Río-Hortega Bereciartu 2020). Il fut ainsi le premier à décrire les caractéristiques particulières des cellules microgliales, capables de modifier leur morphologie pour passer d'un état de repos avec de longues ramifications, à un état activé où elles acquièrent une forme amiboïde, et déduisit leur rôle dans la phagocytose. Il fallut ainsi plus que 75 ans pour établir que la « neuroglia » était constituée de trois grandes catégories de cellules dites « gliales » : les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies, lesquelles ont chacune des fonctions spécifiques (Fan and Agid 2018). Bien qu'observées en même temps que les neurones, les cellules gliales sont restées dans l'ombre de ces derniers pendant de nombreuses années et leurs implications dans le fonctionnement du SNC ne fut étudiées que tardivement.

2.2. L'origine de ces cellules

L'origine des cellules microgliales est un sujet de débat depuis longtemps. De multiples théories ont émergé au cours du temps, et il aura fallu de nombreuses années pour clarifier cette origine, qui ne dérive pas de cellules souche neurales, comme pour les neurones et les astrocytes. Des études chez la souris ont montré que les cellules microgliales dérivent des macrophages primitifs du sac vitellin. Ces cellules colonisent le SNC en développement au cours des stades précoces de l'embryogenèse, entre les jours embryonnaires E9 et E13 chez la souris (**Figure 11**) (Ginhoux et al. 2013). Au moment de leur infiltration, les précurseurs myéloïdes des cellules microgliales présentent une forme amiboïde ronde avec peu ou pas de

prolongements. Une fois la barrière hématoencéphalique complètement fermée et le parenchyme cérébral complètement isolé du compartiment sanguin, ces précurseurs prolifèrent massivement, se différencient sous l'action de plusieurs facteurs de transcription (PU.1, IL-34 et CSF-1) puis prennent finalement leur forme homéostatique avec de fins prolongements. C'est au cours des deux premières semaines postnatales, qu'environ 95% de la population microgliale est établie (Augusto-Oliveira et al. 2019).

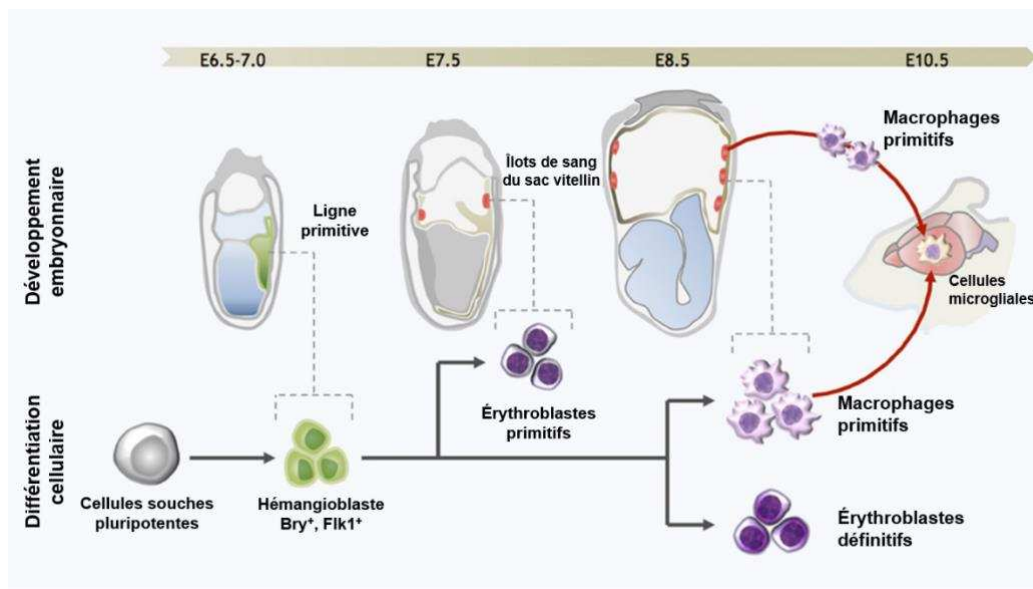


Figure 11 : Colonisation du cerveau par les cellules macrophages primitifs au cours du développement embryonnaire chez la souris. Les cellules hémangioblastes apparaissent dans la ligne primitive postérieure et migrent dans le sac vitellin pour donner naissance aux îlots sanguins. Les érythroblastes primitifs sont alors observés de E7 et E7,5, suivis des érythroblastes définitifs et des macrophages primitifs à E8,5. Au début de la circulation, les macrophages primitifs sortent du sac vitellin et colonisent le cerveau en développement pour ensuite proliférer et se différencier en cellules microgliales. Figure traduites de Guihoux et al. 2013.

Néanmoins, même si ces derniers résultats ont éclairci l'origine de la microglie, cette dernière reste controversée. C'est pourquoi une étude récente, de l'équipe de Valérie Wittamer, a utilisé le traçage génétique chez le poisson zèbre afin de résoudre la question de l'origine des cellules microgliales (Ferrero et al. 2018). Ce travail a mis en lumière que ces cellules sont issues d'une colonisation en deux vagues distinctes du SNC (**Figure 12**). Une première vague, issue de macrophages primitifs, colonise le cerveau à partir de 54 hpf (Herbomel, Thisse, and Thisse 2001) et constitue ainsi une première population de microglies dites embryonnaires. Cependant cette population initiale n'est que transitoire. En effet, ces cellules embryonnaires sont progressivement remplacées, à partir de 20 jpf, par des microglies définitives lesquelles persistent tout au long de la vie adulte. Cette seconde vague de microglie provient de cellules souches hématopoïétiques. Ce travail remet donc en question le modèle

dominant et fournit une preuve supplémentaire de l'existence de plusieurs vagues de peuplement de la microglie, qui mettent en jeu des précurseurs hématopoïétiques distincts (Ferrero et al. 2018). Toutefois, cette colonisation en deux vagues du cerveau par les microglies reste controversée et pourrait constituer une caractéristique évolutive différente des mammifères.

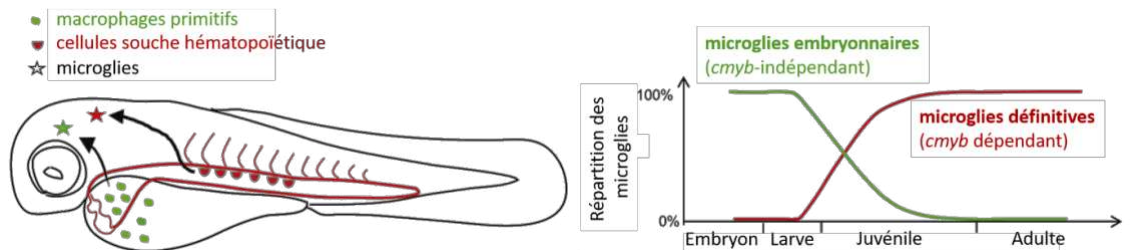


Figure 12 : Schéma de la colonisation du cerveau de poisson zèbre par les cellules microgliales en deux vagues distinctes. Les cellules microgliales colonisent les cerveaux du poisson zèbre en deux vagues successives. Une première vague, issue de macrophages primitifs provenant du sac vitellin, a lieu au cours de l'embryogenèse. Ces cellules sont ensuite remplacées par des microglies définitives issues de l'hématopoïèse. Figure traduite de Ferrero et al. 2018.

2.3. Des cellules pluripotentes

Les cellules microgliales ont longtemps été mises de côté par les scientifiques car définies comme les macrophages spécifiques du SNC, et donc considérées seulement comme des « nettoyeuses », uniquement chargées de protéger le cerveau des agents pathogènes extérieurs et d'éliminer les cellules mortes et les déchets biologiques. Ainsi, pendant des décennies, la microglie était considérée comme étant simplement endormie dans les conditions physiologiques du cerveau, et leur contribution en tant que cellules « activées » dans des conditions pathologiques était principalement délétère. Ce n'est que récemment, grâce à la mise au point de l'imagerie multi-photonique, qu'on a mis en évidence le comportement dynamique de ces cellules qui sont loin d'être au repos dans les conditions physiologiques. Ces observations, ajoutées à d'autres travaux, ont permis de mettre à jour les nombreuses fonctions réalisées par les cellules microgliales dans le contexte physiologique (Tremblay et al. 2015).

2.3.1. Les microglies homéostatiques

Les cellules microgliales représentent environ 10% des cellules gliales du SNC adulte (Salter and Stevens 2017). Le rôle de ces cellules est d'assurer l'homéostasie du cerveau. En conditions physiologiques, les cellules microgliales surveillent de façon continue l'environnement neuronal aux alentours, afin de protéger le cerveau contre d'éventuels

agents pathogènes ou des lésions. Dans ces conditions physiologiques, les cellules microgliales possèdent une morphologie dite « ramifiée », avec un corps cellulaire de petite taille, peu mobile et à partir duquel s'étendent de longs prolongements lesquels se scindent de nombreuses fois afin de donner naissance à un réseau dense de ramifications. Cette morphologie, dite « ramifiée » permet alors aux cellules microgliales de couvrir un espace important autour d'elles et ainsi de scanner un environnement le plus vaste possible. La visualisation *in vivo* du comportement des cellules microgliales montre que les prolongements de ces cellules sont en constant mouvement, s'allongeant et se rétractant de façon régulière afin d'établir des contacts physique avec les neurones environnants et leurs synapses (Davalos et al. 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff, and Helmchen 2005). Dans un cerveau sain, les cellules microgliales ont de multiples fonctions évoluant avec la maturation du cerveau. Ainsi, au cours de développement, les cellules microgliales participent activement à l'élimination des synapses immatures et des neurones surnuméraires. Elles aident aussi à la maturation des oligodendrocytes et au guidage axonal. Après le développement, les cellules microgliales participent à la plasticité synaptique, modulent l'activité neuronale par interactions directes avec les synapses ou *via* les astrocytes, éliminent les agents pathogènes en déclenchant une réponse immune avec la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et régulent l'homéostasie du cerveau (Augusto-Oliveira et al. 2019; Nayak, Roth, and McGavern 2014).

Les cellules microgliales expriment une pléthore de récepteurs membranaires leur permettant de sonder leur environnement, pour y détecter des cellules en détresse ou mortes, des débris ou une accumulation de protéines toxiques, mais aussi des agents pathogènes extérieurs, comme des bactéries ou des virus. Tout d'abord, la microglie exprime des récepteurs purinergiques, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, comme P2Y₁₂ (Rassendren and Audinat 2016). Ces récepteurs sont considérés comme le « nez » des cellules microgliales, leur permettant notamment de détecter des lésions cérébrales grâce aux micro-gradients d'ATP. En effet, l'activation par l'ATP ou l'ADP de ces récepteurs induit un réarrangement des filaments d'actine du cytosquelette *via* l'activation de la GTPases Rac, ce qui provoque l'allongement des prolongements jusqu'au site de production de l'ATP/ADP (Haynes et al. 2006; Li et al. 2012). Une étude récente réalisée par l'équipe de David Attwell s'est aussi penchée sur le rôle des récepteurs P2Y₁₃, lesquels sont exprimés de manière quasi-spécifique par les cellules microgliales et à un niveau semblable à celui des récepteurs P2Y₁₂ (Zhang et al. 2014). Néanmoins la compréhension de leur fonction

au sein des cellules microgliales est beaucoup moins avancée que celle des récepteurs P2Y₁₂. En particulier, le travail de l'équipe de David Attwell a montré que l'absence ou le blocage des récepteurs P2Y₁₃ conduit, entre autre, à une diminution de la ramification des prolongements microgliaux et à une diminution du temps de réaction des cellules microgliales à une source d'ADP, affectant ainsi les capacités de surveillance de la microglie. Ce travail suggère ainsi que les récepteurs P2Y₁₃ agirait en support des récepteurs P2Y₁₂ pour réguler l'architecture et la dynamique des prolongements microgliaux (Kyrargyri et al. 2020). Ces récepteurs purinergiques seraient donc au cœur de la régulation de la dynamique des prolongements microgliaux et permettraient à ces cellules de diriger leur action vers les sites lésionnels, les agents pathogènes et les neurones en détresse ou hyperexcités.

2.3.2. Les microglies activées

En fonction des stimuli qu'elles reçoivent et grâce aux mécanismes qui permettent à ces cellules de les identifier, les cellules microgliales vont adopter des états de différenciation spécifiques qui favorisent, soit les processus de « réparation », soit ceux de « soutien », soit ceux d'élimination. Ainsi, la présence de cellules apoptotiques et autres débris cellulaires déclenchent les mécanismes de phagocytose *via* les récepteurs P2Y₆ et TREM2, notamment (Fu et al. 2014). L'élagage ou le remodelage synaptique sera régulé par les compléments C1q et C3 (Stephan, Barres, and Stevens 2012). Enfin, étant la principale ligne de défense dans le cerveau, la microglie exprime plusieurs récepteurs impliqués dans le contrôle des fonctions immunitaires innées, en particulier les *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), lesquels regroupent trois grandes familles de récepteurs, les récepteurs de type Toll (TLRs), les récepteurs de type Nod (NLRs) et les récepteurs de type RIG1 (RLRs) (El Ali and Rivest 2016). Ces récepteurs reconnaissent deux grands types de ligands :

- Les *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), des molécules intracellulaires libérées dans le milieu extracellulaire à la suite, par exemple, d'un traumatisme crânien, d'une lésion cérébrale ou symptomatique d'une maladie neurodégénérative ;
- Les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), des molécules constitutives d'agents pathogènes exogènes, comme les lipopolysaccharides bactériens ou les ARN viraux.

L'activation de ces récepteurs déclenche l'activation d'une cascade de signalisation menant à l'expression de facteurs de transcriptions, tels que NF- κ B, et à l'activation des

cellules microgliales. Cette activation se traduit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et, la plupart du temps, par une modification de la morphologie des cellules, avec une rétraction de leurs prolongements, une augmentation du volume de leur corps cellulaire et une augmentation leurs déplacements. Ces microglies, dites « amiboïdes » ou « activées », possèdent des caractéristiques proches de celles macrophages. C'est pourquoi la classification de leurs états d'activation a été calquée sur celle des macrophages (**Figure 13**) (Cherry, Olschowka, and O'Banion 2014; Dubbelaar et al. 2018; Orihuela, McPherson, and Harry 2016).

- Le phénotype M1 est défini comme un état pro-inflammatoire, induit par les molécules PAMPS et DAMPs, comme le LPS ou l'interféron- γ (INF γ). Dans cet état, les cellules microgliales produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukines-1 β (IL-1 β), l'IL-6, l'IL-8 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), entre autres, mais aussi des chimiokines comme CCL2. Ces microglies produisent aussi des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'enzyme oxyde nitrique synthase inducible (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). La sécrétion de ces différents composés a pour but d'aider à l'élimination des sources de DAMPs et de PAMPs, afin de protéger les cellules saines. Néanmoins, la production importante et chronique de ces éléments peut empêcher la réparation des dommages causés au SNC voire l'endommager d'avantage.
- Le phénotype M2 correspond, à l'inverse, à un état anti-inflammatoire. Il est induit par l'action des cytokines IL-4, IL-10, IL-13 et TGF β , mais aussi par les glucocorticoïdes. Dans cet état, la microglie libère des molécules anti-inflammatoires, notamment l'arginase-1 (ARg-1), mais aussi des facteurs de croissances, tels que l'IGF-1, la chitinase 3-like 3 (Ym-1) ou la protéine FIZZ1, ainsi que des facteurs neurotrophiques et angiogéniques, comme le BDNF, le NGF, le GDNF. Cet état induit une diminution de la libération d'oxyde nitrique. Ces différentes molécules aident ainsi à la cicatrisation et favorisent la survie des neurones rétablissant ainsi l'homéostasie du SNC après un stress majeur, comme une lésion, une attaque virale ou une infection bactérienne.

Même si ce modèle de l'activation des cellules microgliales a été très utilisé pendant de nombreuses années pour décrire les microglies *in vitro*, il est maintenant admis que ce concept est inadéquat car trop simplifié. En effet, les études récentes de la dynamique des cellules microgliales *in vivo* montrent que ces cellules changent rapidement de phénotype en réaction aux modifications de leur environnement. De plus, des études transcriptomiques sur des

cellules microgliales isolées d'un même cerveau montrent une diversité importante de ces cellules en fonction de la zone du cerveau, de l'âge des animaux et de leur condition pathologique (Gosselin et al. 2014; Hammond et al. 2019; Hickman et al. 2013). Dès lors, les états d'activation M1 et M2 ne doivent être considérés que comme des cas particuliers au sein du vaste panel de phénotypes que peuvent prendre les cellules microgliales (Ransohoff 2016).

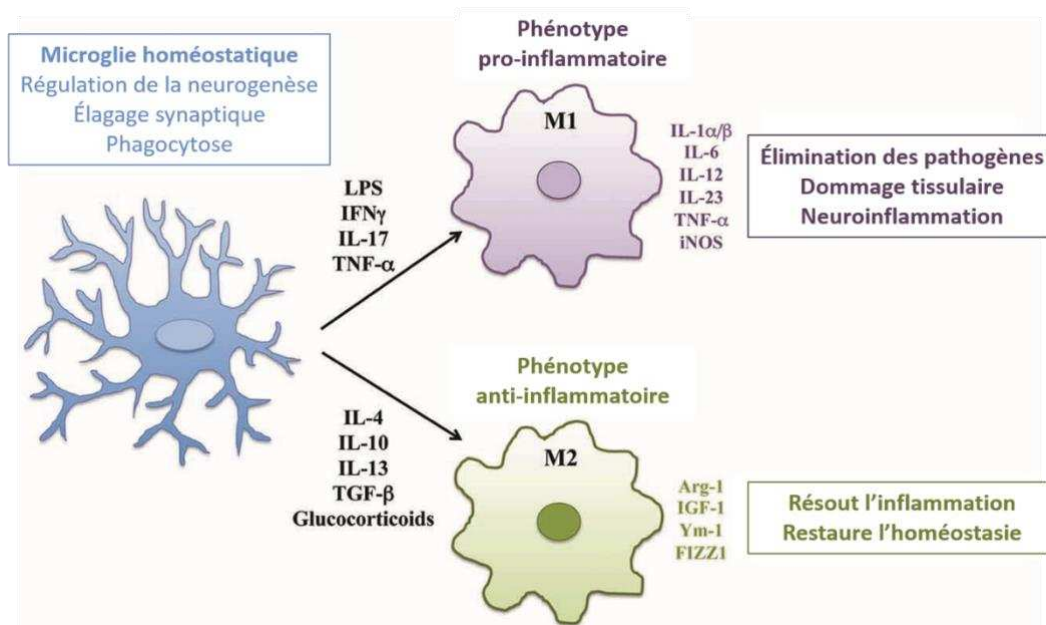


Figure 13 : États d'activation des cellules microgliales : polarisation M1/M2. Dans les conditions physiologiques, les cellules microgliales régulent l'homéostasie du cerveau, en scannant de manière continue les neurones dans leur environnement. Dans le paradigme de polarisation, en réponse à un stress, les cellules microgliales s'activent et acquièrent soit un phénotype pro-inflammatoire, M1 ; soit un phénotype anti-inflammatoire, M2. Figure traduite de Salvi et al. 2017.

2.4. La microglie dans les épilepsies

L'épileptogénèse correspond aux processus dynamiques modifiant progressivement l'excitabilité neuronale et conduisant aux épilepsies. Il a clairement été établi que ces processus peuvent être dus à une grande variété de facteurs, comme des prédispositions génétiques, des troubles durant le développement ou des atteintes neurologiques plus tardives. Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'épileptogénèse soient encore mal compris, plusieurs travaux suggèrent que les cellules microgliales, par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou par un élagage synaptique mal contrôlé, interviennent dans l'apparition des épilepsies. Plus récemment, des altérations du phénotype des cellules microgliales, associées à celle des astrocytes, ont été décrites dans de nombreux modèles animaux d'épilepsie (Patel et al. 2019). De même, l'étude de la microglie à partir de tissus de résection, prélevés sur des patients à des fins thérapeutiques, montre une modification de

l'état d'activation des microglies (Morin-Brureau et al. 2018). Néanmoins, une hétérogénéité importante existe entre les résultats des modèles animaux et les études humaines, mais aussi au sein même de ces études où le phénotype de la microglie peut varier en fonction des types d'épilepsie chez les patients et des modèles utilisés dans les études animales. Face à cette hétérogénéité, il est difficile conclure quant au rôle, néfaste ou bénéfique, des cellules microgliales dans le contexte des épilepsies. Néanmoins, il est clair que la microglie peut jouer un rôle important dans l'épileptogenèse *via* la sécrétion de molécules inflammatoires, dans la phagocytose des débris apoptotiques, dans la modulation de l'activité des neurones et la plasticité synaptique (Figure 14) (Hiragi, Ikegaya, and Koyama 2018).

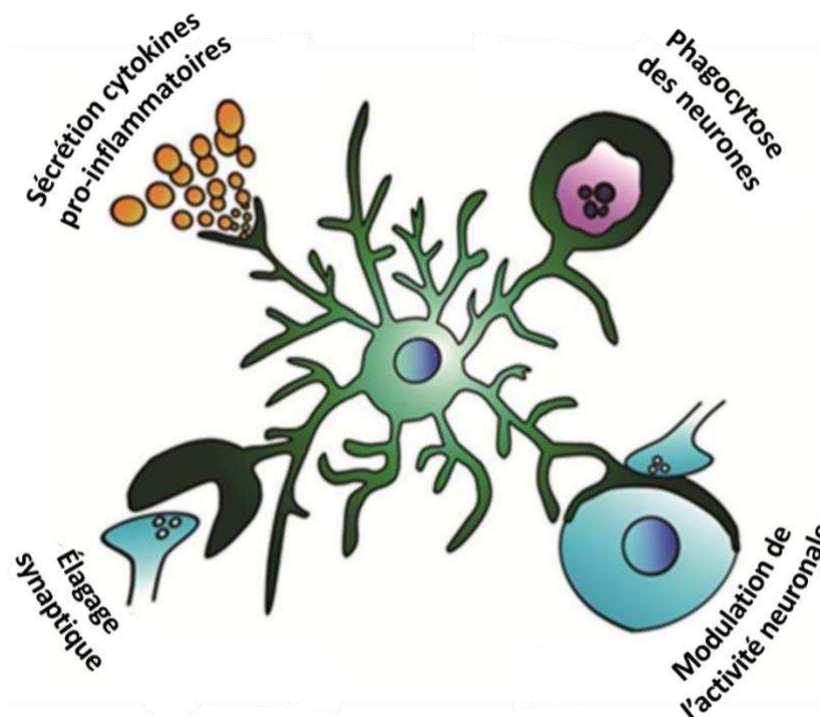


Figure 14 : Rôles potentiels des cellules microgliales dans l'épileptogenèse. De nombreuses théories supposent que les cellules microgliales pourraient être un acteur principal dans les épilepsies par la sécrétion chronique de cytokines pro-inflammatoires, par la phagocytose des neurones, par un élagage synaptique erratique ou par leur capacité à réguler l'activité des neurones. Figure traduite d'Hiragi et al. 2018.

2.4.1. La neuroinflammation : un acteur principal dans la physiopathologie des épilepsies ?

Au cours des 15 dernières années, un nombre croissant d'observations a été rapporté, indiquant une augmentation des processus inflammatoires dans diverses épilepsies focales (Aronica and Crino 2011). On a ainsi observé une augmentation du taux de diverses cytokines pro-inflammatoires dans le sang et surtout dans le liquide céphalo-rachidien, suggérant une origine cérébrale, chez de nombreux patients épileptiques (Auvin et al. 2018; Lehtimäki et al.

2004; Peltola et al. 2002). Des marqueurs de l'inflammation ont aussi été détectés dans les tissus de résection issus de patients souffrant de diverses formes d'épilepsies (Boer et al. 2008; Crespel et al. 2002). De plus, l'analyse de ces tissus a montré une activation des cellules gliales, telles que les microglies, les astrocytes et les cellules endothéliales, mais aussi une infiltration de macrophages périphériques et de monocytes (Bosco, Tian, and Wu 2020; Ravizza et al. 2008). Enfin, l'importance de l'inflammation dans l'épilepsie humaine a été déduite d'observations cliniques indiquant que les stéroïdes et d'autres traitements anti-inflammatoires présentaient une activité anticonvulsive dans certaines formes pharmaco-résistantes d'épilepsies. Des preuves supplémentaires de ce lien ont été apportées par les crises fébriles qui coïncident toujours avec une augmentation des taux d'agents pro-inflammatoires. L'implication des processus inflammatoires dans l'épileptogénèse est maintenant un fait reconnu qui n'est plus sujet à controverse. En revanche, la question de savoir si l'inflammation peut conduire à elle seule à l'épilepsie ou si elle n'est qu'une conséquence des crises, reste ouverte (Vezzani et al. 2011).

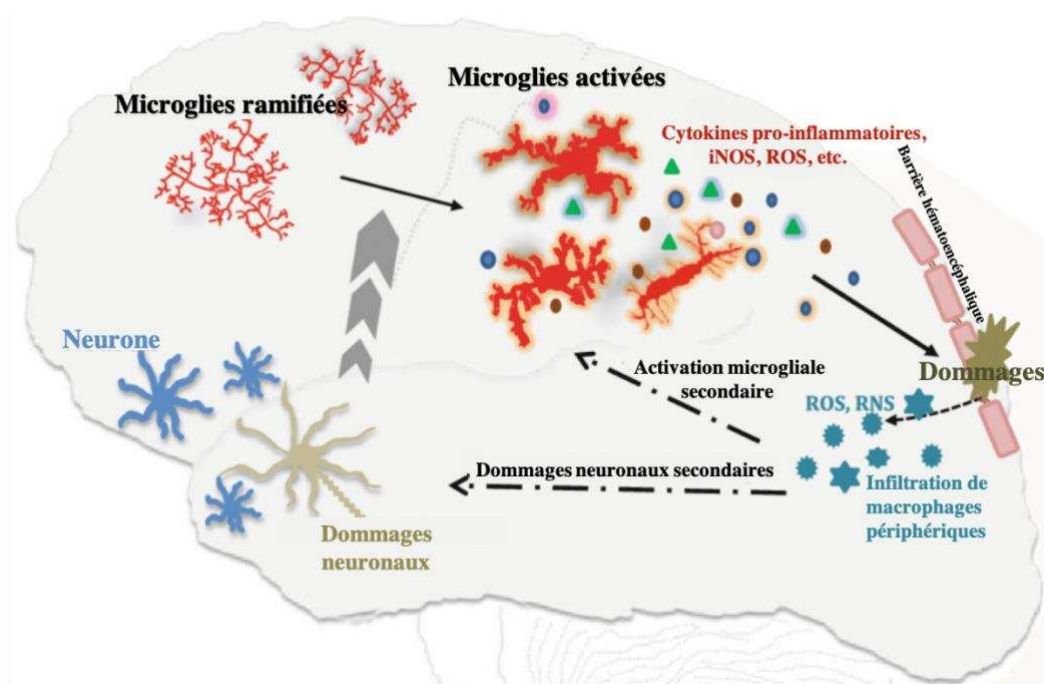


Figure 15 : Cercle vicieux de la neuroinflammation dans les épilepsies.

En effet, d'un côté, de nombreuses études réalisées avec des modèles animaux ont montré que les crises d'épilepsie provoquées par des molécules pro-convulsivantes, ou par des stimulations électriques, entraînent une activation des astrocytes et des cellules microgliales. En réponse à ce stress, ces deux types de cellules sécrètent alors de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α . D'un autre côté, il a été

montré que les cytokines pro-inflammatoires, et l'IL-1 β , tout particulièrement, peuvent, si elles sont produites en très grande quantité, perturber l'activité des neurones, en modifiant le fonctionnement de canaux ioniques voltage- et chimio-dépendants (Viviani, Gardoni, and Marinovich 2007), en potentialisant la transmission glutamatergique (Viviani et al. 2003) et en altérant la transmission GABAergique inhibitrice (Roseti et al. 2015). De plus, la sécrétion chronique de ces molécules pro-inflammatoires fragilise la barrière hématoencéphalique (Marchi et al. 2007) et participe au recrutement de cellules inflammatoires périphériques, comme les neutrophiles, les lymphocytes ou les monocytes (Fabene et al. 2008). Ces cellules contribuent alors à augmentation de la pression inflammatoire du tissu nerveux, exacerbent l'hyperexcitabilité des neurones et accentuent les dommages induit par les crises (Varvel et al. 2016). L'inflammation peut aussi provoquer une réorganisation synaptique et peut aller jusqu'à provoquer la mort des neurones. Cette situation ressemble alors à un cercle vicieux où l'hyperexcitabilité neuronale provoque la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles fragilisent, en retour, les neurones ce qui entraîne une augmentation de leur excitabilité, se traduisant par une augmentation de l'intensité et la fréquence des crises (**Figure 15**). Dès lors, une meilleure compréhension des caractéristiques et des conséquences de la neuroinflammation dans le développement et la perpétuation des crises apparaît comme une condition essentielle pour délimiter le rôle de ce processus dans les épilepsies et ainsi ouvrir la porte à de nouvelles cibles thérapeutiques (Paudel et al. 2018).

2.4.2. Un élagage synaptique non contrôlé

Au cours des années 70, il a été démontré que la densité synaptique corticale est maximale aux alentours de la naissance puis qu'elle diminue pendant l'enfance et l'adolescence jusqu'à l'âge adulte. L'élimination des synapses surnuméraires et immatures ainsi que la maturation morphologique et fonctionnelle ultérieure des synapses restantes jouent un rôle essentiel pour le raffinement des circuits neuronaux et la fonction cérébrale normale (Paolicelli et al. 2011; Schafer et al. 2012). En effet, une densité globale de synapses excessives ou insuffisantes, ainsi qu'un déséquilibre de la balance synaptique excitation/inhibition (E/I), sont au cœur de nombreux troubles du SNC. Comme présenté au début de l'introduction, l'hypothèse selon laquelle l'équilibre de la balance E/I est perturbé en faveur de l'excitation dans un cerveau montrant des crises d'épilepsie est très largement soutenue, même si elle a été contestée après la découverte que des crises peuvent survenir

dans des contextes où la neurotransmission inhibitrice est renforcée (Cope et al. 2009; Shao, Habela, and Stafstrom 2019). Néanmoins, l'hypothèse d'un défaut de la balance E/I dans les épilepsies prédomine largement. De plus, il a été suggéré que le déséquilibre synaptique E/I observé à la suite de certaines maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer, pourrait être à l'origine de l'apparition de crises de type épileptiforme (Vossel et al. 2017). Ainsi, il est fortement probable qu'un déséquilibre synaptique de la balance E/I soit la principale cause de l'épilepsie. Dès lors, une partie de la communauté scientifique pense que cette perturbation de la balance synaptique pourrait être causée par les cellules gliales, notamment les astrocytes, mais, encore plus, les microglies.

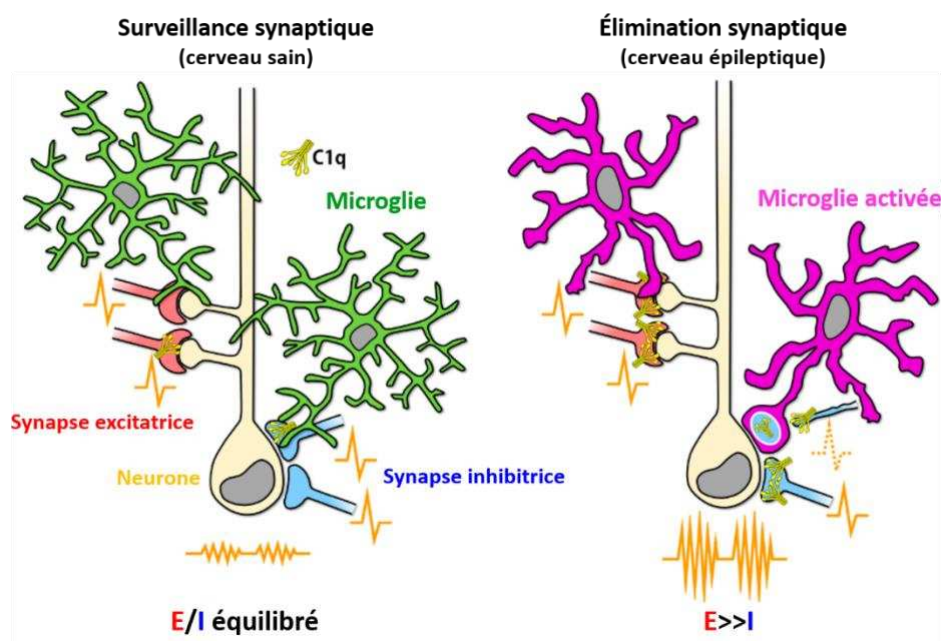


Figure 16 : Mécanisme d'élagage synaptique en condition physiologique et dans un cerveau hyperactif. Dans les conditions physiologiques, les cellules microgliales participent à la plasticité synaptique en éliminant celles les moins actives (excitatrice ou inhibitrice), via l'activation du complément C1q. Dans un cerveau épileptique, les synapses inhibitrices pouvant être déficientes ou moins actives que les synapses excitatrices, elles deviennent alors la cible préférentielle des microglies, ce qui mène à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition. Figure traduite d'Andoh et al. 2019.

En effet, les cellules microgliales sont connues pour participer à l'élimination des synapses surnuméraires lors du développement. Cet élagage synaptique par les cellules microgliales est régulé par l'expression et la reconnaissance des molécules du complément, C1q et C3. Des études ont montré une augmentation du niveau d'expression génique et protéique de ces molécules dans le cerveau des patients épileptiques ainsi que dans des modèles animaux (Aronica et al. 2007; Scharz et al. 2018; Wyatt et al. 2017). La question est alors de savoir ce qui détermine quelles synapses seront éliminées. Des études suggèrent que les synapses les

plus actives, les plus efficaces pour transmettre des réponses post-synaptiques fortes, prennent l'ascendant sur les synapses moins actives et moins efficaces à proximité, provoquant ainsi leur élimination *via* la cascade du complètement, impliquant C1q et C3 (**Figure 16**) (Stephan et al. 2012). Dès lors, si une mutation génétique, du gène *SCN1A* par exemple, ou une molécule exogène, une molécule organophosphorée, induit une diminution de l'activité des neurones inhibiteurs, ou si, à l'inverse, elle provoque une augmentation de l'activité des neurones excitateurs, cela pourrait alors créer un différentiel d'activités entre les synapses excitatrices et inhibitrices menant à l'élimination des synapses inhibitrices moins actives. Ce processus pourrait alors expliquer la diminution des synapses inhibitrices dans les épilepsies, ce qui pourrait être à l'origine des crises.

2.4.3. Un contrôle de l'activité neuronale

Des études récentes ont montré que les cellules microgliales sont capables de moduler l'excitabilité des neurones. En effet, il avait déjà été montré par le passé, que les microglies sont attirées par les neurones ayant une activité importante. En effet, des études réalisées chez le rat et le poisson zèbre montrent qu'une sur-activation des récepteurs NMDA provoque une sécrétion d'ATP *via* les canaux pannexines présents au niveau post-synaptique (Li et al. 2012). Cette sécrétion provoque alors l'attraction des prolongements microgliaux *via* l'activation des récepteurs P2Y₁₂, déjà mentionnés précédemment. L'une de ces études a montré que la perte de fonction du gène *P2Y₁₂* entraîne une sensibilité accrue au kainate chez le rat, caractérisée par une augmentation des phénotypes comportementaux de type épileptiformes ainsi qu'une mortalité plus importante des animaux exposés au kainate. Ce travail suggère que les cellules microgliales possèdent un rôle protecteur, dépendant de *P2Y₁₂*, dans leur réponse à une hyperexcitabilité neuronale (Eyo et al. 2014). Néanmoins, même si ces études montrent que les contacts établis entre les synapses et les cellules microgliales réduisent l'excitabilité des neurones, aucune hypothèse sur le mode d'action entraînant cette diminution n'a été émise, jusqu'à très récemment.

En effet, le travail de Badimon et collaborateurs a montré que l'ablation totale des cellules microgliales dans un cerveau adulte entraîne une sensibilité accrue de ces animaux à des molécules pro-convulsivantes (Badimon et al. 2020), confirmant ainsi le potentiel rôle bénéfique des cellules microgliales dans un contexte épileptique. Cette étude s'est ensuite concentrée sur l'étude de l'implication des cellules microgliales dans l'excitabilité des

neurones dopaminergiques dans le striatum et montre que l'ablation des cellules microgliales présentes uniquement au sein de la substance grise du striatum est suffisante pour induire une sensibilité accrue aux agonistes des récepteurs dopaminergiques D1. Cette observation montre l'importance des interactions entre les cellules microgliales et les synapses. Ces résultats ont aussi confirmé l'importance de la signalisation purinergique dans le guidage des prolongements microgliaux vers les synapses hyperactives. À ce stade, les auteurs ont alors pensé qu'en plus de son rôle chimioattractant, l'ATP sécrétée par les synapses pourrait être transformée en adénosine, laquelle est un puissant suppresseur de l'activité neuronale. En accord avec cette hypothèse, les auteurs ont montré que les cellules microgliales expriment à leur surface les enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP en adénosine. De plus, la perturbation de cette transformation, comme l'ablation du récepteur à l'adénosine (A_1R) dans les neurones dopaminergiques D1, entraînent une augmentation de la sensibilité des animaux aux effets épileptogènes des agonistes des récepteurs dopaminergiques D1. Ainsi, ce travail est le premier à proposer un mécanisme d'action des microglies dans la régulation de l'activité des neurones, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives quant aux rôles des cellules microgliales dans les épilepsies (**Figure 17**) (Badimon et al. 2020).

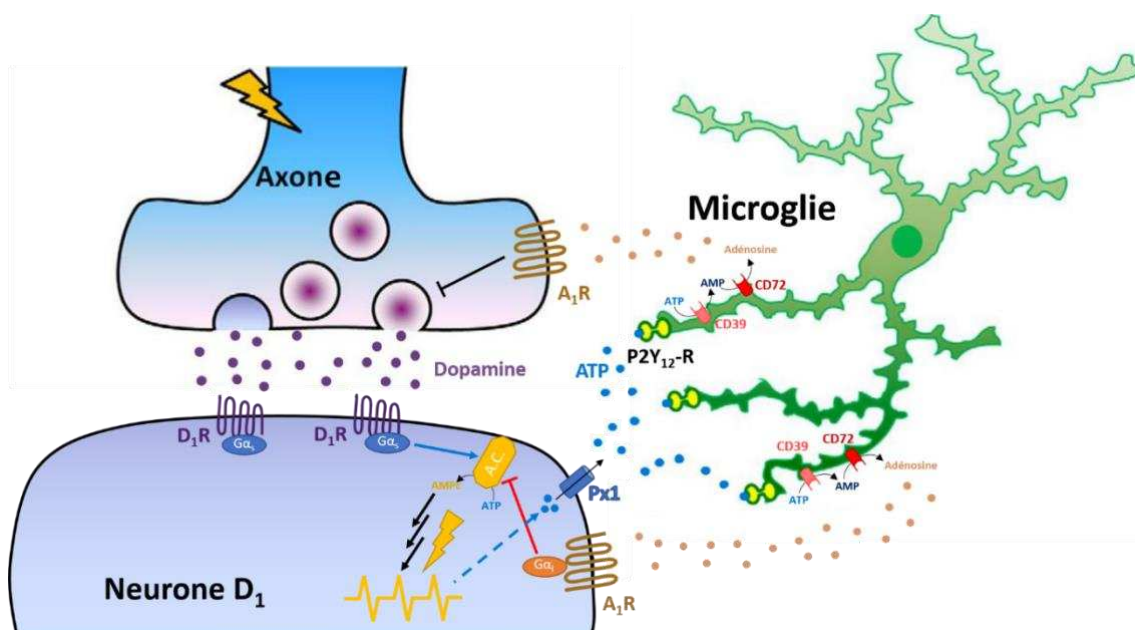


Figure 17 : Hypothèse du mécanisme de modulation de l'activité neuronale par les cellules microgliale. Cette hypothèse fut établie à partir de l'étude de l'activité de neurones dopaminergiques. Lorsque ces derniers sont surexcités, ils libèrent de l'ATP via des canaux pannexin1. Cet ATP ainsi libéré est ensuite repéré par les cellules microgliales via l'activation des récepteurs P2Y₁₂. Cette activation entraîne alors le recrutement des processus microgliaux vers le site de libération de l'ATP. En plus d'utiliser l'ATP comme senseur, les cellules microgliales peuvent le transformer en AMP puis en adénosine par l'action successive des enzymes CD39 et CD72. Une fois arrivée sur le site de libération de l'ATP, cette adénosine produite localement par les microglies peut activer les récepteurs A₁R, soit au niveau présynaptique et inhiber la libération des vésicules

synaptiques, soit au niveau postsynaptique en inhibant l'adénylate cyclase (A.C.). Ces deux actions conjointes mènent alors à la diminution de l'activité du neurone. Figure adaptée à partir de Eyo et al. 2014.

2.5. La microglie comme nouvelle cible thérapeutique

Parce que l'hyperactivité synchrone des neurones est symptomatique des épilepsies, les chercheurs et les cliniciens ont concentré leurs efforts sur la compréhension du fonctionnement des neurones. Ces études ont alors placé leurs espoirs de cibles thérapeutiques sur des molécules agissant directement sur les neurones, et modulant ainsi leur activité et pouvant conduire au contrôle des crises d'épilepsie. Cependant, un tiers des patients ne répondent pas à ces traitements symptomatiques, et doit faire face à des crises pharmaco-résistantes. Cette proportion, qui demeure inchangée depuis de nombreuses années, suggère que les stratégies thérapeutiques actuelles pour le traitement des épilepsies ont potentiellement atteint leur limite et qu'il est nécessaire de se tourner vers des voies thérapeutiques différentes de la simple manipulation de l'activité des neurones pour le traitement des crises pharmaco-résistantes. Nous proposons ici les cellules microgliales comme des cibles thérapeutiques prometteuses pour le développement de la prochaine génération de traitements pour les épilepsies réfractaires. En effet, nous avons vu dans les paragraphes précédents l'implication des cellules microgliales dans l'apparition et l'aggravation des crises d'épilepsie, par leur participation à la neuroinflammation mais aussi par leur implication dans la plasticité synaptique. Dès lors, la modulation de leurs activités peut être considérée comme une stratégie thérapeutique alternative d'un grand intérêt potentiel pour diminuer l'hyperexcitabilité des neurones dans les épilepsies.

3. Le poisson zèbre comme modèle d'épilepsie

3.1. Le poisson zèbre : un modèle vertébré au cœur de la recherche en biologie

3.1.1. Description du poisson zèbre

Le poisson zèbre, de son nom scientifique *Danio Rerio*, est un petit poisson d'eau douce de la famille des cyprinidés que l'on trouve en Asie du sud-est, essentiellement, en Inde, au Bangladesh et au Népal. Il vit principalement dans des eaux stagnantes, telles que les étangs, les rizières ou les bras morts des rivières, mais aussi dans les cours d'eau peu profonds et à faible courant, où l'eau a un pH neutre, voire légèrement basique, et où la température est comprise entre 16,5°C et 35°C, selon les saisons et les sites (Sundin et al. 2019). Ce sont des animaux ovipares qui atteignent leur maturité sexuelle vers 3 à 4 mois, et dont la taille adulte

n'excède pas 4 cm. Leur espérance de vie en aquarium est d'environ 3 ans. Dans leur milieu naturel, ils vivent en banc d'une douzaine d'individus au minimum et pouvant aller jusqu'à une centaine. Leur régime alimentaire comprend du zooplancton, des larves d'insecte et des petits crustacés (Engeszer et al. 2007). Ces poissons sont prisés des aquariophiles depuis de longues années, mais ils sont aussi utilisés depuis les années 80 comme organisme modèle dans les laboratoires de biologie.

3.1.2. De l'étude du développement embryonnaire à la toxicologie

Le poisson zèbre est un animal de plus en plus commun dans les laboratoires, où il est utilisé, comme animal modèle. Il s'agit, en effet, d'un animal très simple à élever, à l'entretien peu coûteux et dont la petite taille facilite l'hébergement en grand nombre. Le poisson zèbre possède aussi une grande fertilité dans les conditions optimales d'élevage ; une température de $25\pm 1^\circ\text{C}$ et un pH d'environ 7,2. Dans ces conditions, une femelle bien nourrie peut pondre jusqu'à 300 œufs le même jour, et ceci, toutes les semaines. La fécondation et le développement des embryons ont entièrement lieu en dehors du corps de la mère et celui-ci se divise en plusieurs phases. La première phase, dite embryonnaire, s'étend de la fécondation jusqu'à la sortie du chorion, laquelle intervient entre 48 et 72 heures post-fertilisation (hpf) selon les lignées. À partir de 5 jours post-fertilisation (jpf), s'en suit la phase larvaire, durant laquelle l'animal commence à nager et à se nourrir. Cette phase se termine lors de la métamorphose, intervenant vers 20 à 25 jpf, et durant laquelle les larves subissent d'importantes modifications morphologiques pour se transformer en juvéniles. Enfin, le poisson est considéré comme adulte lorsqu'il est capable de se reproduire, soit aux alentours de 3 à 4 mois (**Figure 18**) (Parichy et al. 2009).

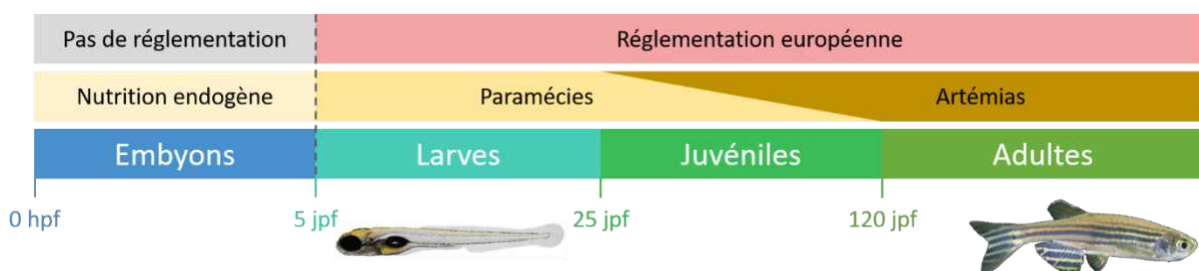


Figure 18 : Chronologie du développement du poisson zèbre. Cette fresque présente les différents stades de développement, de l'embryon à l'adulte, du poisson zèbre. En addition, sont présentés les différents modes de nutrition en fonction de l'âge, ainsi que les stades assujettis à la réglementation européenne.

Il est important de noter que, jusqu'à 5 jpf, l'embryon se nourrit exclusivement des réserves de nourriture endogènes stockées dans le sac vitellin au cours de l'ovogenèse. Dès

lors, jusqu'à leur première prise de nourriture externe, les embryons ne sont pas considérés comme des êtres vivants et ne sont pas assujettis aux réglementations européennes sur l'expérimentation animale (Commission Européenne 2012).

Enfin, la pigmentation des embryons commence à apparaître vers 24 hpf. Avant cela, ils sont complètement transparents ce qui permet d'observer facilement l'embryogenèse et l'organogenèse sous un stéréo-microscope. De plus, il est possible d'inhiber la pigmentation des larves, grâce au PTU, et ainsi prolonger la transparence des embryons jusqu'à 8-9 jpf, en changeant l'inhibiteur quotidiennement (Karlsson, Von Hofsten, and Olsson 2001). Cette transparence, ajoutée à la grande variété de lignées transgéniques capables d'exprimer divers marqueurs fluorescents dans les différentes organes et tissus grâce à des promoteurs spécifiques, font du poisson zèbre un modèle idéal pour étudier les processus développementaux en temps réel, ainsi que les modifications structurales et le comportement de différentes cellules au sein d'un organisme vivant (Vacaru et al. 2014).

Ces caractéristiques ont ainsi fait de lui un animal idéal pour l'étude des différentes étapes du développement embryonnaire. De plus, son statut de vertébré, le grand nombre d'embryons qu'il peut produire et la perméabilité de ceux-ci aux molécules de petite taille, en font aussi un animal très intéressant pour l'étude de la toxicité des molécules chimiques et de leur(s) mode(s) d'action (Bambino and Chu 2017). Le poisson zèbre fait ainsi partie des tests préconisés par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) pour évaluer, de façon standardisée, la toxicité de nouvelles molécules en prévision de leur demande de mise sur le marché (OCDE 1998, 2013). C'est à partir des années 2000 que le poisson zèbre connaît un véritable essor dans la recherche biologique, grâce au séquençage complet de son génome, à l'amélioration des techniques de mutagenèse, mais aussi aux nouvelles techniques d'imagerie *in vivo*. Il est de nos jours utilisé en cancérologie, en neurobiologie, en médecine régénérative, en tératologie, pour lutter contre l'obésité, contre le diabète, etc. (Cassar et al. 2020; Goessling and Sadler 2015; Gore et al. 2018; Hason and Bartůněk 2019).

3.1.3. Un modèle pour l'étude des maladies neurologiques humaines

Depuis une dizaine d'année, le poisson zèbre est devenu l'un des principaux modèles animaux pour l'étude des maladies neurologiques humaine. Premièrement, le séquençage de son génome a montré une homologie d'environ 70% avec l'Homme. De plus, 82% des gènes

humains associés à une maladie possèdent un homologue chez le poisson zèbre (Howe et al. 2013). Deuxièmement, le développement du SNC du poisson zèbre est bien connu et son cerveau possède de fortes similitudes, tant structurelles que fonctionnelles, avec celui des mammifères. La formation de cet organe commence dès 16 hpf avec la formation du tube neural et l'apparition des premiers neurones, puis elle est suivie par la différenciation des structures principales du cerveau à partir de 17 hpf (Mueller and Wullmann 2016). On y retrouve les mêmes neurotransmetteurs et les mêmes populations de neurones ; dopaminergiques, GABAergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques et cholinergiques, qui sont à la base du fonctionnement du cerveau et de la balance excitation/inhibition (Raj et al. 2020). La barrière hématoencéphalique commence à se former à 20 hpf et elle devient complètement opérationnelle à partir de 3 jpf (Quiñonez-Silvero, Hübner, and Herzog 2020). Les cellules microgliales colonisent le cerveau à partir de 60 hpf et le peuplement est achevé à 4 jpf (Herbomel, Thisse, and Thisse 1999; Herbomel et al. 2001). Enfin, les premiers axones myélinisés sont détectés à partir de 4 jpf, mais le cerveau n'est complètement myélinisé qu'après 10 jpf (Brösamle and Halpern 2002). Dès lors, le poisson zèbre possède les caractéristiques génétiques, moléculaires et cellulaires de base pour la modélisation des maladies neurologiques humaines.

Outre ces prédispositions précédemment citées, le poisson zèbre présente d'autres avantages pour la modélisation et l'étude des maladies neurologiques. Il existe, tout d'abord, de nombreuses techniques qui permettent d'inhiber l'expression de n'importe quel gène d'intérêt, soit temporairement, soit définitivement, mais aussi de surexprimer des protéines *via* la transgénèse. La transparence des larves permet ensuite d'observer en temps réel, dans un organisme vivant, le développement de la pathologie, ainsi que les modifications qu'elle induit, grâce à l'expression de transgènes codant pour des rapporteurs fluorescents dans des tissus ou cellules ciblées. Enfin, la grande fertilité du poisson zèbre permet la réalisation de cribles *in vivo* à haut débit, pour identifier des molécules modifiant la progression de la maladie. Ainsi, le poisson zèbre se présente comme une alternative aux modèles rongeurs pour l'étude des maladies neurologiques humaines, ainsi que pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux traitements. Son utilisation est actuellement répandue pour étudier les tauopathies, la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, les maladies provoquant la dégénérescence des neurones moteurs comme la sclérose latérale

amyotrophique, l'épilepsie, et bien d'autres encore (Kabashi et al. 2011; Laird and Robberecht 2011; Xi, Noble, and Ekker 2011).

3.1.4. Un outil de choix pour la médecine « personnalisée »

La médecine personnalisée a pour but de développer des traitements sur mesure pour les patients chez qui les thérapies actuelles ne fonctionnent pas. Il s'agit donc d'une médecine développée et centrée autour des patients et de leur maladie. Cette approche nécessite de collecter les données génomiques de chaque patient et de les corrélérer aux données précédemment obtenues sur les maladies concernées (Sigman 2018). Cette approche innovante est permise grâce aux nouvelles technologies et aux analyses de big data permettant de prédire la réponse du patient aux différents traitements et ainsi de proposer le traitement le plus efficace et ayant le moins d'effets secondaires indésirables. Cependant, l'analyse du génome entier des patients met en lumière un grand nombre de mutations associées directement ou non à la maladie. Dès lors, le principal facteur limitant à la mise en place de cette méthode est de déterminer les gènes les plus importants dans la progression de la maladie, ceux, qui constituent des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments (Goetz and Schork 2018). C'est là qu'intervient le poisson zèbre. En effet, l'association de sa forte homologie génétique avec l'Homme et les nombreuses techniques de modifications génétiques disponibles, ajoutées à son développement rapide, permettent de générer aisément des poissons zèbres porteurs de mutations au niveau des gènes homologues à ceux identifiés chez les patients. Il est ainsi possible d'étudier l'impact de l'inactivation, partielle ou totale, de ces gènes sur la physiopathologie des maladies. De plus, le criblage à haut débit de bibliothèques de molécules sur ces animaux pourrait conduire à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces et avec moins d'effets secondaires (Baxendale, van Eeden, and Wilkinson 2017).

3.2. Intérêt pour les épilepsies

3.2.1. Génération de modèles rapides et simplifiés

L'inactivation ou la surexpression de gènes d'intérêt dans les différents modèles animaux est un moyen efficace pour étudier l'implication de ces gènes dans la physiopathologie des maladies étudiées. De nos jours, il existe plusieurs méthodes "d'annotation" génétique, la création de modifications ponctuelles et ciblées de la séquence de n'importe quel gène, dont la facilité de mise en œuvre dépend principalement de l'animal modèle. Le développement

externe et rapide des embryons du poisson zèbre est un atout important pour la réalisation de ces modifications génétiques.

1.3.3.1. Inactivation transitoire d'un gène ciblée

L'injection de morpholino-oligonucléotides anti-sens (morpholino) dans des embryons tout juste fécondés représente la technique la plus ancienne et la plus répandue pour l'inactivation transitoire d'un gène. Les morpholinos peuvent avoir deux méthodes d'action: soit, ils inhibent la traduction de l'ARNm en s'hybridant au niveau de la région entourant le codon ATG, soit ils bloquent l'épissage de l'ARN pré-messager en s'hybridant au niveau des séquences d'une jonction exon-intron. Dans les deux cas, la présence du morpholino empêche la production de la protéine codée par le gène ciblé, entraînant une perte-de-fonction plus ou moins complète de ce gène. La conception de ces oligonucléotides anti-sens est simple et leur synthèse est rapide. Ainsi, l'injection de morpholino est une technique puissante et rapide pour étudier les conséquences de l'inactivation d'un gène d'intérêt. Néanmoins, plusieurs problèmes existent. En effet, même si leur injection au stade une cellule permet une inactivation rapide et efficace au cours des stades précoces du développement, leur effet s'estompe rapidement et il est fréquent que l'inactivation du gène cible ne soit plus que partiel à 3 jpf et disparaisse après 5 jpf. Plus grave encore, il a été montré que les phénotypes observés avec certains morpholinos ne sont pas spécifiques du gène ciblé (Van Gils and Vanakker 2019; Stainier et al. 2017).

1.3.3.2. Génération de lignées KO stable

À cause des problèmes et des limitations inhérentes aux morpholinos, d'autres techniques permettant de réaliser des lignées KO stables peuvent être utilisées. Il est tout d'abord possible d'utiliser des agents mutagènes chimiques, comme le N-nitroso-N-éthylurée, qui sont capables d'induire des mutations ponctuelles aléatoires dans le génome. Cette technique a permis de générer de nombreuses lignées mutantes stables qui sont toujours utilisées aujourd'hui. Cependant, les mutations induites étant complètement aléatoires, il n'est pas rare de devoir séquencer des dizaines de milliers d'amplicons avant qu'une mutation avec des conséquences fonctionnelles dans un gène d'intérêt puisse être trouvée, ce qui rend cette technique longue et peu efficace.

C'est pourquoi les techniques d'annotation du génome (*genome editing*) utilisant des méganucléases ont été développées. Il en existe trois grandes familles : les nucléases à doigts

de zinc (ZFN), les nucléases effectrices type activateur de transcription (TALEN) et le système CRISPR-Cas9. Les outils ZFN et TALEN sont fondés sur l'association d'une désoxyribonucléase sans aucune spécificité de séquence, avec des domaines protéiques de liaison spécifique à l'ADN, permettant ainsi de cibler précisément l'action de la nucléase et donc de produire des mutations à des localisations prédéfinies dans le génome (Leong et al. 2011; Liu, Zhao, and Cheng 2016). Néanmoins, le mécanisme de reconnaissance de la séquence d'ADN de ces deux techniques étant fondé sur des interactions ADN/protéines, il plus long et plus compliqué de générer des enzymes spécifiques au site de mutation voulu. De plus, leur utilisation *in vitro* ou *in vivo* peut entraîner une toxicité voire une létalité en raison de la modification de sites non ciblés et du clivage indésirable de l'ADN à ces endroits.

Contrairement à ces deux techniques précédentes, la reconnaissance de la séquence ADN dans le système CRISPR-Cas 9 est contrôlée par les interactions classiques ARN-ADN du modèle Watson-Crick, ce qui offre de nombreux avantages par rapport aux ZFN et aux TALEN : une conception et une réalisation plus faciles, une prédiction accrue des sites non-spécifiques et la possibilité de modifier plusieurs sites génomiques simultanément (Brocal et al. 2016; Gonzales and Joanna Yeh 2014). Ainsi, la simplicité, les rendements et le bas coût du système CRISPR-Cas9, ont permis la démocratisation rapide de cette technique en biologie, et notamment, chez le poisson zèbre. En effet, grâce au séquençage complet de l'ADN du poisson zèbre et de son développement externe et rapide, il est facile de produire des mutations ciblées puis d'en étudier les conséquences.

3.2.2. Visualisation en 3D et non invasive de l'activité neuronale

Les ions calcium, Ca^{2+} , sont des messagers intracellulaires majeurs régulant de nombreuses fonctions cellulaires telles que la contraction musculaire, l'excitabilité cellulaire ainsi que la régulation de l'expression de certains gènes (Islam 2020). Dès lors, la compréhension du rôle des signaux calciques et l'étude de leurs caractéristiques spatiales et temporelles au sein des cellules et des tissus sont essentielles pour accroître nos connaissances sur la régulation des systèmes organiques (Russell 2011). C'est pourquoi, de nombreux bio-senseurs fluorescents sensibles aux ions calcium ont été développés (Russell 2011). Les premières études des signaux calciques étaient limitées aux cellules en culture. Les expériences effectuées sur des tranches de cerveaux en culture ont permis d'observer la complexité spatiotemporelle de ces signaux. Néanmoins, il est vite apparu qu'il était

préférable d'étudier ces signaux calciques au sein d'un organisme vivant, notamment pour l'étude du SNC. En effet, le cerveau est unique dans son organisation, laquelle est caractérisée par un vaste réseau de cellules inter-communicantes. Ainsi, une tranche de cet organe ne peut refléter la complexité réelle des signaux calciques ayant lieu *in vivo*. En outre, des études ont montré que l'excitabilité des neurones dépend de nombreux facteurs et, notamment, de la composition ioniques du milieu. C'est pour toutes ces raisons qu'il est préférable d'étudier les signaux calciques neuronaux au sein d'un organisme vivant.

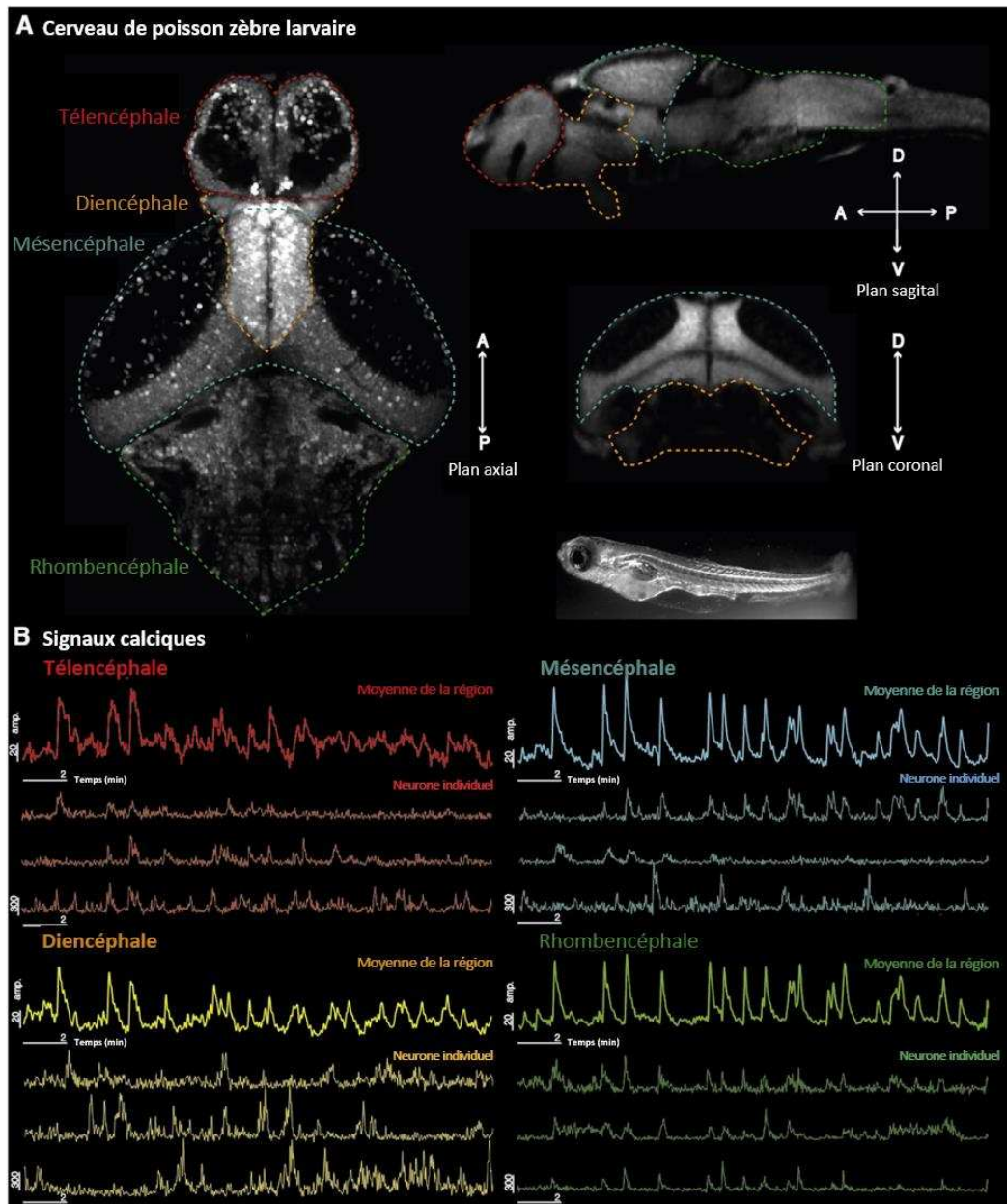


Figure 19 : Exemple d'imagerie calcique chez l'embryon de poisson zèbre. (A) Projection axiale, sagittale et coronale d'un cerveau d'une larve de poisson zèbre âgée de 7 jpf et enregistrée par imagerie multi-photonique. (B) Exemple de fluctuation de concentration intracellulaire dans 4 régions du cerveau (Télocéphale, Diencephale, Mésencéphale et Rhombencéphale) ainsi que des exemples de cellules individuelles dans chaque zone. Figure traduite de Burrows et. 2020.

Ainsi, ce n'est que récemment, grâce notamment à l'amélioration des systèmes de microscopie, qu'il est devenu possible de visualiser les signaux calciques d'un organe ou d'un organisme entier au sein d'un animal vivant, comme le poisson zèbre (Figure 19). Ces études ont aussi nécessité le développement de nouveaux bio-senseurs calciques, comme le système GCaMP. Ce système permet d'exprimer, sous le contrôle du promoteur désiré, une protéine chimère constituée d'une GFP, d'une calmoduline et d'un peptide de synthèse (Akerboom et al. 2012). La calmoduline constitue le détecteur de calcium par sa forte affinité avec les ions calciques. De son côté, le peptide a été synthétisé de manière à interagir avec la calmoduline lorsque celle-ci est liée à un ion calcique. Dès lors, la fixation d'ions calciques à la calmoduline entraîne le repli du peptide synthétique sur cette dernière, provoquant ainsi une rigidification de la structure protéique globale, ce qui induit une forte augmentation de la fluorescence émise par la GFP. Plusieurs constructions GCaMP ont été développées afin d'améliorer la sensibilité, la vitesse de réponse, et pour augmenter le différentielle de fluorescence de la GFP. Néanmoins, malgré l'amélioration des techniques d'imagerie *in vivo*, l'enregistrement des signaux calciques a, pendant longtemps, été limité aux structures de surface, plus facilement accessibles. Le développement de la microscopie multi-photonique a permis d'étendre ces capacités d'imagerie aux tissus plus épais et ainsi d'étudier des champs plus profonds (Helmchen et al. 2001). Enfin, les méthodes de microscopie en champ lumineux (light-sheet microscopy) ont permis d'étendre l'étude des influx calciques à des systèmes en 3 dimensions, permettant ainsi une meilleure résolution spatiale (Ahrens et al. 2013).

Dans le cadre de l'étude de l'épilepsie, l'imagerie calcique constitue alors une méthode non-invasive extrêmement utile pour enregistrer et étudier l'activité neuronale (Burrows et al. 2020). En effet, le calcium joue un rôle essentiel dans l'excitabilité neuronale, notamment pour la conduction du potentiel d'action mais aussi pour la sécrétion des neurotransmetteurs. Ainsi, lorsque la fréquence de balayage est suffisamment élevée, les variations de la concentration intracellulaire des ions calciques dans les neurones montrent une forte corrélation avec les enregistrements électrophysiologiques de ces mêmes cellules (Brenet et al. 2019; Liu and Baraban 2019). Le suivi des influx calciques dans les neurones offre une solution alternative à l'étude de l'excitabilité neuronale ainsi qu'une résolution spatiale nouvelle, comparée aux enregistrements « classiques » de l'activité électrique des neurones. Dès lors, la petite taille du cerveau des embryons de poisson zèbre (< 1 mm³) ainsi que sa transparence permettent de visualiser les influx calciques au niveau du cerveau entier,

permettant de réaliser la cartographie, en temps réel et à l'échelle d'un neurone, de l'ensemble de l'activité du cerveau d'un embryon vivant (**Figure 19**) (Ahrens et al. 2013). Cette cartographie permettra dans les épilepsies, d'identifier l'origine d'une crise et sa propagation au sein du réseau neural, et ainsi détecter de potentielles voies préférentielles d'excitation dans les modèles génétiques utilisés. Ainsi, l'imagerie calcique des neurones d'un embryon de poisson zèbre fournit, pour la première fois, l'opportunité unique d'étudier la dynamique des réseaux neuronaux à l'échelle du cerveau entier dans les différentes épilepsies d'origines génétique ou environnementale (**Figure 19**) (Burrows et al. 2020).

3.2.3. Une activité motrice reflétant l'hyperexcitation neuronale

Les larves de poisson zèbre commencent à nager librement à 4 jours après la fertilisation et montrent un répertoire de reflex moteurs stéréotypés qui fonctionnent sur le schéma caractéristique du système nerveux des vertébrés. Dès lors, le suivi de l'activité locomotrice de ces larves peut révéler des atteintes du SNC. C'est pourquoi, des outils ont été développés afin de suivre, de façon automatique, le déplacement de plusieurs dizaines de larves simultanément et, ainsi, de quantifier la distance parcourue, la vitesse de nage et la durée du mouvement, de chacune des larves pendant un temps donné. De nouveaux protocoles ont été mis au point au cours des années afin d'étudier les réponses moteurs des larves suite à des stimuli visuels, acoustiques, électriques, tactiles voire même olfactifs (Khalili et al. 2019; Liao et al. 2019; Liu et al. 2018; Sztal et al. 2016). Enfin, des tests plus précis ont été développés et permettent d'analyser les interactions sociales, d'évaluer la mémoire ou, encore, de mesurer le niveau d'anxiété des larves, des alevins, mais surtout, des adultes (Dwivedi et al. 2019; Egan et al. 2009; Orger and De Polavieja 2017). Regroupés, ces tests font du poisson zèbre un modèle vertébré attrayant pour le dépistage et l'étude des conséquences principalement moteurs, mais aussi comportementales, induites par des mutations génétiques ou par des troubles du développement.

Concernant les crises d'épilepsie, ces dernières peuvent se manifester chez le poisson zèbre, par des épisodes d'hyperactivité locomotrice, par des événements de type convulsifs ou par des "pertes de posture" (perte de conscience). Ces caractéristiques ont permis de classer les crises en trois stades en fonction de leur sévérité. Le stade I est caractérisé par une augmentation générale de l'activité de la nage avec des soubresauts. Au stade II, les larves montrent une activité de nage circulaire rapide de type tourbillon. Le phénotype le plus fort

est observé au stade III, où les larves présentent des crises de type tonico-clonique avec d'intenses convulsions suivies d'une perte de posture (Baraban et al. 2005). Ces différentes caractéristiques moteurs sont facilement observables et quantifiables grâce au suivi automatisé du mouvement des larves, que ce soit dans les modèles pharmacologiques ou les modèles génétiques d'épilepsie. Dès lors, le suivi de l'activité locomotrice qui peut être réalisé simultanément avec plusieurs dizaines d'individus (96 au maximum), constitue une méthode alternative, simple, sensible et très puissante, pour la détection et l'étude des crises d'épilepsie chez le poisson zèbre.

3.2.4. Un animal au service du criblage de molécules thérapeutiques

Pendant les 20 dernières années, la stratégie principale pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques était de trouver une cible clé dans une maladie, puis de synthétiser une molécule capable de moduler spécifiquement l'action de cette cible pour arrêter la maladie (Swinney and Anthony 2011). Cette stratégie demande beaucoup de temps et d'argent, ne serait-ce que pour la synthèse de la meilleure molécule modulatrice, puis les nombreux tests d'efficacité et de toxicité, dans différents modèles cellulaires et animaux. De plus, ces travaux, le plus souvent, ne mènent à rien, car la molécule sélectionnée n'est finalement pas assez efficace ou trop toxique. C'est pourquoi, au cours des dernières années, on constate un renversement des stratégies avec un regain d'intérêt pour le criblage de bibliothèque de "vieilles" molécules en se basant sur leur capacité à diminuer les phénotypes de maladies nouvelles dans des cellules en culture ou des modèles animaux simples. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce changement. Tout d'abord, le criblage phénotypique de petites molécules permet d'identifier de nouveaux médicaments sans avoir de cible thérapeutique spécifique au préalable. Il est même possible que l'effet thérapeutique observé soit la conséquence d'une action simultanée de la molécule sur plusieurs cibles (MacRae and Peterson 2015; Zheng, Thorne, and McKew 2013). De plus, le criblage phénotypique permet de détecter plus rapidement les potentiels effets d'un traitement, conduisant ainsi à la découverte de molécules plus efficace et moins toxiques Si le criblage de ces molécules peut être réalisé de manière plus simple et à plus grande échelle avec des cellules en culture, ces dernières restent loin d'un organisme vivant entier. C'est pourquoi, ont été développés de nombreux modèles de maladies humaines chez des modèles animaux simples, comme le *C. elegans*, le xénope, la drosophile et le poisson zèbre. De plus, l'utilisation de ces modèles

animaux fournit des informations précieuses sur l'absorption, la distribution, le métabolisme et la toxicité des composés, en plus des données sur l'efficacité de la molécule dans le modèle de maladie. Enfin, le développement de nouvelles technologies, des automates utilisant des plaques à 96 puits, ont permis d'améliorer le débit des criblages (Giacomotto and Ségalat 2010).

Il est permis de penser que dans un proche futur le poisson zèbre jouera un rôle central dans le criblage de petites molécules thérapeutiques pour un grand nombre de maladies. En effet, sa grande fertilité, son développement rapide, sa forte homologie génétique avec l'être humain, les nombreuses techniques de modifications génétiques et la large gamme de lignée reproductrices, font du poisson zèbre un modèle animal idéal pour l'étude de l'effet thérapeutique de petites molécules dans les maladies génétiques humaines. Néanmoins, ces études s'effectuent majoritairement sur les stades embryonnaire et larvaire du poisson zèbre, des périodes où les techniques d'imagerie sont le plus utilisable, ce qui peut constituer une limitation car les mécanismes neuronaux à ces stades de développement ne sont pas forcément à l'image de ceux d'un cerveau plus âgé. Concernant l'épilepsie, le suivi de l'activité locomotrice constitue une méthode idéale pour le criblage de nouveaux traitements anticonvulsivants dont l'efficacité pourra ensuite être vérifiée en enregistrant l'activité électrique des neurones ou les variations des influx calcique dans ces mêmes cellules. Un tel protocole a d'ailleurs conduit à la découverte du clémizole, un nouvel antiépileptique qui est actuellement en phase III d'essai clinique (Scott C Baraban, Dinday, and Hortopan 2013).

3.3. Les modèles d'épilepsies chez le poisson zèbre

3.3.1. Les modèles pharmacologiques : le PTZ

Il existe de nombreuses molécules, dites pro-convulsivantes, qui sont utilisées dans les modèles animaux afin d'étudier les effets d'une hyperexcitabilité neuronale : le kaïnate (Alfaro, Ripoll-Gómez, and Burgos 2011), la pilocarpine (Vermoesen et al. 2011), la picrotoxine (Yang et al. 2017), la caféine (Wong et al. 2010), la ginkhotoxine (Lee et al. 2012) et la strychnine (Stewart et al. 2012). Cependant, toutes ces molécules restent très peu utilisées et leurs effets sur les larves ou les poissons zèbres adultes sont très peu documentés dans la littérature. La principale molécule pro-convulsivante prédominantes chez le poisson zèbre est le pentylènetétrazole (PTZ). Il s'agit de l'une des premières molécules pro-convulsivantes utilisées pour induire une activité de type épileptique dans des modèles animaux (Porter et

al. 1984). Malgré sa découverte il y a plus de 30 ans, le mécanisme par lequel le PTZ est capable d'induire des crises de type épileptiforme n'est pas encore complètement défini. Il est suggéré que cette capacité viendrait de l'interaction du PTZ avec les récepteurs ionotropiques et métabotropiques du GABA (Macdonald and Barker 1978). En effet, le PTZ est un antagoniste des récepteurs GABA_A, réduisant ainsi la probabilité d'ouverture du canal et augmentant son état fermé (Huang et al. 2001), ce qui expliquerait l'efficacité des anti-épileptiques agissant sur les transmissions GABAergiques. Le PTZ peut également interagir et moduler la perméabilité des canaux potassiques voltage-dépendants et augmenter la dépolarisation des neurones (Madeja et al. 1996). Dès lors, le blocage des récepteurs GABAergiques associé à l'augmentation de la dépolarisation des neurones peuvent entraîner un déséquilibre entre l'excitation et l'inhibition dans le cerveau et ainsi déclencher des crises épileptiformes.

L'utilisation du PTZ chez le poisson zèbre a été décrite pour la première par Baraban en 2005. Contrairement au rongeur, il n'est pas utile d'injecter la molécule, car un simple traitement par baignade suffit à induire des modifications comportementales en quelques minutes, voire secondes. En fonction des concentrations ainsi que du temps d'exposition, les larves montrent tout d'abord une augmentation générale de leur activité locomotrice. Puis, apparaît un comportement de nage circulaire rapide de type tourbillon. Enfin, au stade le plus sévère, les larves présentent des crises de type tonico-clonique avec d'intenses convulsions suivies d'une perte de posture (Baraban et al. 2005). Ces modifications comportementales sont parfaitement corrélées avec l'augmentation de l'excitabilité neuronale enregistrée en EEG et par imagerie calcique des neurones (Afrikanova et al. 2013; Turrini et al. 2017). Le traitement au PTZ induit aussi une augmentation très importante de l'expression du gène *c-fos* dans différentes régions du cerveau dès 15 min après l'incubation (Baraban et al. 2005). Cette expression, rapides et transitoires, est un marqueur établi de l'augmentation de l'excitabilité neuronale (Morgan et al. 1987). De la même manière, des crises épileptiformes peuvent également être induites par le PTZ chez le poisson zèbre adulte, soit par baignade, soit par injection intrapéritonéale. Les caractéristiques comportementales de ces crises sont proches de celles observées chez les larves et leur intensité dépend de la concentration utilisée et du temps d'exposition (Mussulini et al. 2013). Enfin, il est aussi à noter que cette activité neuronale accrue ainsi que ce comportement épileptique peuvent être évités en traitant les animaux avec des molécules antiépileptiques classiques comme l'acide valproïque ou le diazépam.

Les modèles de crises épileptiformes induites par le PTZ chez les larves ont principalement été utilisés pour le criblage et l'identification de petites molécules et de composés naturels ayant une potentielle activité antiépileptique (Baxendale et al. 2012; Challal et al. 2014). Il est important de noter que certains de ces composés ont également montré un effet dans des modèles murins d'épilepsie, confirmant ainsi l'utilité du poisson zèbre comme modèle fiable pour la découverte de nouveaux anticonvulsivants (Buenafe et al. 2013; Orellana-Paucar et al. 2013; Rahn et al. 2014). De plus, grâce aux nombreuses techniques de modification génétique disponibles chez le poisson zèbre, le modèle PTZ a permis l'identification de gènes modulant les crises, en utilisant à la fois l'inhibition temporaire de gènes ciblés *via* des morpholinos ou par des lignées de poissons zèbres mutants (Baraban et al. 2007; Mei et al. 2013; Teng et al. 2011). L'utilisation de PTZ chez l'adulte permet, quant à elle, d'étudier des phénotypes comportementaux plus complexes (Lee et al. 2010; Wong et al. 2010).

3.3.2. Les modèles génétiques

Malgré des progrès significatifs ces dernières années, de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires de l'épileptogenèse restent incompris, freinant la découverte de nouvelles options thérapeutiques, notamment pour les épilepsies pédiatriques rares et pharmaco-résistantes. Parmi les hypothèses actuelles, la plus répandue reste celle d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition *via*, notamment, la diminution de la transmission GABAergique ou un élagage incontrôlé des synapses par les cellules microgliales. D'autres mécanismes potentiels sont depuis apparus, comme l'astroglie, l'inflammation, l'apoptose des cellules neuronales ou la dérégulation de la voie mTOR (Łukawski et al. 2018). Néanmoins, il convient de garder à l'esprit qu'une grande majorité de ces hypothèses ont été formulées à partir d'observations faites sur des animaux sains chez lesquels les crises d'épilepsie ont été induites chimiquement. Dès lors, il peut être compliqué de séparer l'impact de la molécule et les conséquences des crises. De plus, l'épileptogenèse est généralement un long processus, pouvant commencer des mois ou des années avant l'apparition de tout symptômes, et au cours desquels prennent place des modifications moléculaires et cellulaires menant aux crises d'épilepsie. Dans la plupart des syndromes d'épilepsie d'origine génétique, les premières crises se manifestent durant la petite enfance. Ceci laisse donc à supposer que les modifications menant à ces crises prennent place pendant le développement du fœtus ou peu de temps après la naissance. Dès lors, l'utilisation des larves de poisson zèbre s'avère

idéale pour surveiller et suivre en temps réel les changements cérébraux ayant cours pendant cette période. En effet, le développement *ex utero* des embryons, leur transparence et les nombreuses lignées transgéniques exprimant des rapporteurs fluorescents dans des cellules ciblées, associés à la microscopie confocale, permettent un traçage rapide et efficace des changements dynamiques ayant lieu dans le cerveau des larves. De nombreux modèles d'épilepsie génétique ont ainsi été développés chez le poisson zèbre (**Tableau 4**).

Parmi ces modèles, on trouve une lignée portant une mutation du gène *scn1Lab* : le mutant *Didy*^{S552} (Schoonheim et al. 2010). Comme mentionné au début de cette introduction, le gène *scn1Lab* est l'homologue du gène *SCN1A* humain. Dès lors, ce mutant *Didy*^{S552} constitue l'opportunité pour étudier les conséquences du dysfonctionnement des canaux sodiques voltages-dépendants sur l'épileptogénèse. Phénotypiquement, ce mutant montre des défauts morphologiques mineurs caractérisés par une hyperpigmentation des larves et une incapacité à gonfler leur vessie natatoire. Ces mutants homozygotes ne survivent pas au-delà de 12-14 jours après fertilisation. De façon intéressante, ces larves montrent des défauts locomoteurs à partir de 4 jpf, avec une augmentation significative de leur activité de nage. De plus, l'enregistrement de l'activité neuronale de ces larves montre des événements épileptiformes spontanés et récurrents à partir de 4 jpf (Scott C Baraban et al. 2013). La réponse du mutant *scn1Lab*^{-/-} aux différentes molécules antiépileptiques s'est également avérée très similaire à celle couramment observée chez les patients atteints du syndrome de Dravet. En effet, le traitement des larves avec du valproate, du diazépam, du bromure de potassium ou du stiripentol, réduit significativement la survenue des événements épileptiformes. La plupart des autres molécules antiépileptiques n'ont, en revanche, aucun effet sur la fréquence des crises. Il convient aussi de noter que la carbamazépine, l'éthosuximide et la vigabatrine, induisent une aggravation des phénotypes épileptiques (Scott C Baraban et al. 2013). Ce mutant montre aussi une diminution de la glycolyse et de la respiration mitochondriale (Kumar et al. 2016). De la même manière, l'inhibition temporaire du gène *scn1Lab* par l'utilisation d'un morpholino induit les mêmes caractéristiques morphologiques que le mutant *Didy*^{S552}, un comportement de type hyperactif et des crises épileptiformes. Ces larves montrent aussi une sensibilité accrue à la chaleur (Zhang et al. 2015). Plus récemment, nous avons montré que ces embryons, aussi appelés morphants, présentent une augmentation globale de la mort cellulaire. De plus, le suivi du nombre de neurones excitateurs et inhibiteurs *via* des lignées transgéniques, a montré une perte

spécifique des neurones GABAergique entre 3 et 4 jpf menant à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition. Ce défaut a aussi été confirmé à l'échelle synaptique à 5 jpf en étudiant l'accumulation des protéines PSD95 et géphyrine (Brenet et al. 2019). Enfin l'analyse transcriptomique unicellulaire réalisée dans un nouveau mutant *scn1Lab^{-/-}*, généré par CRISPR-Cas9, a confirmé une perte GABAergique progressive entre 4 et 7 jpf ainsi qu'une astroglie (Tiraboschi et al. 2020). En résumé, ces études mettent en lumière les anomalies neuronales précoces sous-jacentes au syndrome de Dravet. Dans l'ensemble, les données comportementales et électrophysiologiques obtenues, à la fois à partir de mutants stables mais aussi par des morphants, confirment la pertinence de la mutation du gène *scn1Lab* comme modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre. D'ailleurs, ces animaux ont été utilisés pour trouver de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces dans le syndrome de Dravet, comme le clémizole (Scott C Baraban et al. 2013; Griffin et al. 2017), qui est maintenant en phase II d'essai clinique, et la fenfluramine (Zhang et al. 2015) ou le cannabidiol, lesquels sont en cours d'autorisation (Griffin et al. 2020; Thornton et al. 2020).

Tableau 4 : Liste des modèles génétiques d'épilepsie chez le poisson zèbre

Gène Humain	Gène poisson zèbre	Méthode	Phénotype(s)	Référence(s)
<i>ALDH7A1</i>	<i>aldh7a1</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Modèle d'épilepsie pyridoxino-dépendente (PDE) • Corps courbé (10 jpf) • Comportement hyperactif (10-13 jpf) • Crises épileptiformes spontanées dans le tectum optique (9-11 jpf) • Supplémentation en lysine induit des crises plus précoces et une mort prématurée • Diminution de la synthèse du GABA et déficience en vitamine B6 • Mort à 14 jpf 	(Pena et al. 2017; Zabinyakov et al. 2017)
<i>CACNA1A</i>	<i>cacna1aa</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperpigmentation • Difficulté à gonfler leur vessie nataoire • Réduction de l'activité locomotrice (4 jpf) • Crises épileptiformes spontanées dans le tectum optique (9 jpf) 	(Gawel et al. 2020)
<i>CLN3</i>	<i>cln3</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité au sein du chorion : enroulement et coup de queue • Taille du cerveau plus faible (32 hpf), corps courbé, sac vitellin plus gros et zone péricardique plus importante (4 jpf) • Réponse aux stimuli sensoriels diminués (4 jpf) • Prolifération cellulaire anormale, augmentation de la mort cellulaire et activité mitochondriale réduite (4 jpf) • Activité épileptiforme en EEG (4 jpf) • Mort prématurée à 5-6 jpf 	(Wager et al. 2016)
<i>DEPDC5</i>	<i>depdc5</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité au sein du chorion : enroulement et coup de queue (28 hpf) • Réponse aux stimuli sensoriels diminués • Crises épileptiformes spontanées dans le tectum optique (4-6 jpf) • Phénotypes sauvés par traitement avec GABA and rapamycine 	(de Calbiac et al. 2018)
<i>DEPDC5</i>	<i>depdc5</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité au PTZ accrue • Défauts des réseaux GABAergique (6 jpf) • Augmentation de l'activité de mTor (7 jpf) • Activité locomotrice diminuée (8 jpf) • Crises épileptiformes spontanées dans le tectum optique (9 jpf) • Phénotypes sauvés par traitement avec GABA and rapamycine • Mort à 14 jpf 	(Swaminathan et al. 2018)

<i>GABRA1</i>	<i>gabra1</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Activité locomotrice moins importante à l'obscurité (5-6 spf) • Augmentation de l'activité locomotrice (4 jpf-5,5 spf) et de l'excitabilité neuronale (8 jpf) suite à un flash lumineux (épilepsie photosensible) • Réduction des crises par traitement avec différentes molécules antiépileptiques (Valproate, Clonazepam, Leviteracetam, carbamezepine) (5-6 spf) • Pas de modifications de la structure du cerveau • Défauts des réseaux GABAergiques (8 jpf) • Mort à 6 spf 	(Samarut et al. 2018)
<i>GABRG2</i>	<i>gabrg2</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Activité locomotrice moins importante à l'obscurité (5 jpf) • Augmentation de l'activité locomotrice (3 - 6 jpf) et de l'excitabilité neuronale (5 jpf) suite à un flash lumineux (épilepsie photosensible) • Diminution de la moyenne de survie 	(Liao et al. 2019)
<i>LGI1</i>	<i>lgi1a</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Taille de la tête et des yeux plus faible, raccourcissement de la taille du corps, œdème péricardique • Apoptose plus importante pendant le développement embryonnaire • Comportement hyperactif (3 jpf) • Augmentation de l'expression de c-fos (3 jpf) • Sensibilité au PTZ accrue 	(Teng et al. 2010)
<i>LGI1</i>	<i>lgi1b</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Microcéphalie, œdèmes péricardique important, corps courbé, hydrocéphalie dans les régions du mésencéphale et du cerveau postérieur • Apoptose plus importante pendant le développement embryonnaire • Sensibilité au PTZ accrue 	(Teng et al. 2011)
<i>OCRL1</i>	<i>ocr1</i>	MO Mutant	<ul style="list-style-type: none"> • Cerveau dysmorphique (1 jpf) • Apoptose plus importante • Diminution de la voie Akt • Activité épileptiforme spontanée dans le télencéphale en EEG (6 jpf) 	(Ramirez et al. 2012)
<i>PK1</i>	<i>pk1a</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Corps plus court et courbé (2 jpf) • Défauts de la couche plexiforme interne rétinienne (3 jpf) • Sensibilité au PTZ accrue 	(Mei et al. 2013)
<i>SCN1A</i>	<i>scn1Lab</i>	Mutant ENU	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperpigmentation, vessie natatoire non gonflée et corps légèrement courbé • Comportement hyperactif (4-5 jpf) • Activité épileptiforme spontanée dans le cerveau en EEG et en imagerie calcique des neurones (4-7 jpf) • Glycolyse et respiration mitochondriale diminuée (4-6 jpf) • Défauts de la balance excitation/inhibition au niveau neuronal et synaptique (7 jpf) • Diminution des niveaux de sérotonine (7 jpf) • Mort à 14 jpf 	(Scott C Baraban et al. 2013; Grone, Qu, and Baraban 2017; Kumar et al. 2016; Sourbron et al. 2016; Tiraboschi et al. 2020)

<i>SCN1A</i>	<i>scn1Lab</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperpigmentation, vessie natatoire non gonflée et corps légèrement courbé • Comportement hyperactif (4-5 jpf) • Activité épileptiforme spontanée dans le cerveau en EEG et en imagerie calcique des neurones (4-7 jpf) • Défauts de la balance excitation/inhibition au niveau neuronal et synaptique (4-5 jpf) • Augmentation de la mort cellulaire (4 jpf) • Sensibilité plus importante aux fortes températures (5-7 jpf) 	(Brenet et al. 2019; Zhang et al. 2015)
<i>STX1B</i>	<i>stx1b</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de vessie natatoire • Pas de réponse aux stimuli sensoriels chez 40% des larves (4jpf) • Comportement épisodique anormal (5 jpf) • Activité épileptiforme spontanée dans le télencéphale en EEG (5 jpf) 	(Schubert et al. 2014)
<i>STXBP1</i>	<i>stxbp1a</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperpigmentation • Rythme cardiaque plus faible (3 jpf) • Développement cranio-facial anormal (5jpf) • Immobile et sans réponse à l'extinction de la lumière (5 jpf) • Diminution du métabolisme (5 jpf) • Mort à 10 jpf 	(Grone et al. 2016)
<i>STXBP1</i>	<i>stxbp1b</i>	Mutant CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperpigmentation • Activité épileptiforme spontanée dans le télencéphale en EEG (5 jpf) • Réponse diminuée à l'extinction de la lumière (5 jpf) 	(Schubert et al. 2014)
<i>TRAPPC6B</i>	<i>trappc6b</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Microcéphalie • Augmentation de l'apoptose • Sensibilité au PTZ accrue • Comportement anormal et activité calcique neuronale accrue • Diminution de la moyenne de survie 	(Marin-Valencia et al. 2017)
<i>UBE3A</i>	<i>mib1</i>	Mutant ENU	<ul style="list-style-type: none"> • Microcéphalie • Augmentation de l'expression de BDNF et du peptide YYa • Diminution de l'expression des gènes <i>gad1</i>, <i>calbindine</i> et <i>parvalbumine</i> • Activité épileptiforme spontanée (3jpf) • Comportement hyperactif (3 jpf) 	(Hortopan, Dinday, and Baraban 2010)
<i>ZFH3</i>	<i>zfh3</i>	MO	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité au PTZ accrue • Comportement anormal 	(Fuller et al. 2018)

Objectifs de la thèse

Les épilepsies sont des maladies de plus en plus fréquentes et les mécanismes à l'origine de l'apparition des crises restent encore mal compris. De plus, les traitements fondés sur le contrôle direct de l'activité des neurones restent inefficaces chez plus d'un tiers des patients et, plus particulièrement, dans les épilepsies de l'enfant. Dès lors, le premier objectif de mon travail de thèse fut d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires ayant lieu au cours du développement et menant à l'apparition des crises d'épilepsie. Mon second objectif fut d'étudier une nouvelle stratégie thérapeutique pour les épilepsies en modulant l'activité des cellules microgliales.

Afin de réaliser ces objectifs, j'ai pris avantage de l'embryon de poisson zèbre dont le développement rapide et *ex utero*, associé aux nombreuses lignées transgéniques, facilite la visualisation, en temps réel, des modifications cellulaires et moléculaires ayant lieu au cours de cette phase. De plus, de par sa forte homologie génétique avec l'Homme, les différentes méthodes d'annotation génétique et les similarités de son système nerveux central, le poisson zèbre est un animal idéal pour modéliser les maladies neurologiques humaines. Enfin, l'importance cruciale d'étudier la dynamique des cellules microgliales dans un animal vivant n'a fait qu'entériner le choix du poisson zèbre pour ce travail.

J'ai ainsi :

- I. Observé une modification de la balance excitation/inhibition au niveau neuronale et synaptique suite à la perte de fonction du gène *scn1Lab*, pouvant être à l'origine des crises épileptiformes chez les embryons ;
- II. Caractérisé la dynamique et l'état d'activation des cellules microgliales au sein du cerveau hyperexcité d'un organisme vivant et montré l'importance des cellules microgliales dans la modulation de l'excitabilité neuronale ;
- III. Étudié les effets d'un traitement à la carbétocine sur le développement des crises épileptiformes ;
- IV. Développé et caractérisé un nouveau modèle d'épilepsie d'origine environnementale utilisant un organophosphoré.

CHAPITRE II :
MATÉRIELS &
MÉTHODES

1. Élevage et lignées utilisées

1.1. Conditions d'élevage

Les poissons zèbre sont élevés au sein de l'animalerie agréée du laboratoire (N° agrément : 2012-15/676-0069), dans des aquariums contenant de l'eau osmosée supplémentée avec du chlorure de sodium (5 mM), du chlorure de potassium (0,17 mM) et du chlorure de calcium (0,33 mM), que l'on appelle communément « Fish Water ». La température, le pH et les concentrations en nitrates et nitrites de l'eau sont des paramètres contrôlés régulièrement et maintenus, respectivement, à 25-27°C ; 6,8-7,2 ; 5-10 mg/L et < 0,025 mg/L. Les poissons sont nourris trois fois par jour avec de la nourriture qui varie selon leur âge. Les larves sont nourries avec des paramécies, des protozoaires ciliés ; les poissons juvéniles et jeunes adultes (< 1 an) avec des artémias vivants, une espèce de crustacé vivant dans les marais salants ; enfin, les poissons les plus âgés reçoivent de la nourriture lyophilisée, Zebrafeed (SPAROS®). Les poissons sont aussi soumis à un cycle de 12 h de jour / 12 h de nuit.

1.2. Obtention et élevage des embryons

Les embryons destinés à l'expérimentation sont obtenus selon le protocole suivant. La veille du jour de ponte, en fin d'après-midi, des bacs contenant des billes de couleurs sont placés au fond des aquariums hébergeant les lignées que l'on souhaite reproduire. Ces billes servent à la fois pour stimuler le comportement sexuel des poissons, *via* leur couleur, mais aussi pour protéger les embryons pondus de l'appétit de leurs parents et des autres poissons. Le lendemain matin en fin de matinée, les bacs de billes sont retirés des aquariums et l'eau qu'ils contiennent est ensuite filtrée afin de récupérer les embryons, lesquels sont alors repartis dans des boîtes de Pétri (au maximum 60 embryons par boîte) contenant de la Fish Water supplémentée avec 0,002% de bleu de méthylène puis gardées dans un incubateur à 28,5°C jusqu'à 4 jours post-fertilisation (jpf). Si nécessaire, notamment pour les études par microscopie confocale, 0,03 mg/L de phénylthiourée (PTU) sont ajoutés à l'eau d'élevage à partir de l'âge d'un jour post-fertilisation afin d'inhiber la pigmentation des embryons et ainsi maintenir leur transparences jusqu'à la fin de l'expérimentation.

1.3. Lignées utilisées

Dans ce travail, nous avons utilisé de nombreuses lignées transgéniques afin de visualiser différents types cellulaires. J'ai principalement utilisé la lignée transgénique Tg[*HuC:GCaMP5G*], qui nous a été donnée par George Debrégeas (Laboratoire Jean Perrin, Paris) qui exprime un bio-senseur des ions calciques dans les neurones afin de suivre les influx

calciques au cours du temps (Akerboom et al. 2012). J'ai également utilisé la lignée transgénique Tg[mpeg1:mcherryF], qui nous a été donnée par Jean-Pierre Levrard (Institut Pasteur), et qui exprime la molécule fluorescente mCherry dans les macrophages/microglies (Ellett et al. 2011). Cette lignée m'a permis de visualiser les cellules microgliales des embryons *in vivo*. La lignée sauvage AB a été utilisée pour les études de l'activité locomotrice, mais aussi pour les immunohistochimies. Enfin, la lignée transgénique Tg[il-1 β :GFP], qui nous a été donnée par Georges Lutfalla (Laboratory of Pathogen Host Interaction, Montpellier) a été utilisée pour étudier les cellules microgliales exprimant le gène *il-1 β* (Nguyen-Chi et al. 2015).

2. Utilisation de morpholinos oligonucléotides anti-sens

2.1. Séquence des morpholinos utilisés

J'ai utilisé deux morpholinos différents au cours de ma thèse :

- Le premier, de séquence 5'-CTGAGCAGCCATATTGACATCCTGC-3', a été utilisé à la concentration de 0,62 mM afin d'inhiber la traduction de l'ARNm codant la protéine Scn1Lab et ainsi générer le modèle Dravet.
- Le deuxième, de séquence 5'-GATATACTGATACTCCATTGGTGGT-3', a été utilisé à la concentration de 0.88 mM afin de bloquer la traduction de l'ARNm codant le facteur de transcription PU.1, qui est impliqué dans la différenciation des macrophages (Smith et al. 2013), et ainsi générer des embryons dépourvus de cellules microgliales

Ces deux morpholinos ont toujours été co-injectés avec 0,03 mM de RhodamineB dextran, témoin d'injection, et 0,1 mM de KCl.

2.2. Micro-injection des embryons

La veille de la micro-injection, les poissons sont placés dans des aquariums d'accouplement selon un ratio de une femelle pour un mâle et séparés par une cloison transparente. Le lendemain matin, les séparations sont enlevées à partir d'une heure après l'allumage de la lumière et à intervalle de 30 minutes environ et en surveillant le comportement des couples. Les œufs sont récupérés dans les minutes qui suivent la ponte et sont placés sur une lame de micro-injection. Un micro-capillaire en verre étiré est rempli de la solution à injecter contenant le morpholino, la RhodamineB et le tampon KCl dilué dans de l'eau milliQ. La pression d'injection est ensuite réglée afin d'éjecter environ 1,7 nL de ce mélange. Les injections sont réalisées à la jonction entre la première cellule et le sac vitellin. Les embryons injectés sont ensuite transférés dans une boîte de Pétri contenant de la Fish

Water supplémentée avec 0,002% de bleu de méthylène pour éviter les moisissures, puis incubés dans un incubateur à 28,5°C. Entre 5 hpf et 1 jpf, les embryons sont observés à la loupe fluorescente afin de sélectionner ceux montrant une coloration forte et uniforme de la rhodamine dans tout le corps, preuve de la réussite de la micro-injection.

3. Traitement à la carbétocine

La carbétocine (BACHEM) qui est soluble dans l'eau, a été diluée dans de l'eau milliQ à la concentration de 10 mM. Les embryons ont été exposés à 8 μ M de carbétocine entre 2 et 4 jpf, jour de l'analyse des embryons. La solution de carbétocine à 8 μ M a été préparée de façon extemporanée à partir de la solution stock à 10 mM et le traitement a été renouvelé tous les jours.

4. Étude de l'excitabilité neuronale

4.1. Imagerie calcique

Les embryons âgés de 4 jpf ont été paralysés à l'aide de bromure de pancuronium 300 μ M (Sigma) et immobilisés, côté dorsal vers le bas, au centre d'une chambre d'enregistrement dans 1,5% d'agarose à bas point de fusion, recouvert de Fish Water contenant 0,03 mg/L de PTU et 300 μ M bromure de pancuronium. La chambre est ensuite placée sous un microscope confocal inversé, Leica SP8, équipé d'un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Les variations de la concentration intraneuronale des ions Ca^{2+} ont été détectées en enregistrant la fluorescence au niveau d'un seul plan focal du tectum optique à la résolution 512 x 512 pixels et à la vitesse de 2 Hz pendant 1 h. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. Les variations de fluorescence ($\Delta F/F_0$) ont été calculées en soustrayant l'intensité de fluorescence moyenne de toutes les images puis en normalisant avec cette même moyenne. La dérive de fluorescence au cours du temps a été corrigée en soustrayant la moyenne des valeurs les plus basses, valeurs inférieures à la médiane, dans une fenêtre glissante de 20 s autour du point d'analyse. Toutes les augmentations de fluorescence supérieures à 0,04 $\Delta F/F_0$ ont été considérées comme des événements d'influx d'ions calciques. Étant donné que le système de détection peut détecter de faux événements, tous ont été vérifiés manuellement.

4.2. Électrophysiologie

Les embryons âgés de 4 jpf ont été paralysés en utilisant 300 μ M de bromure de pancuronium et immobilisés, face ventrale vers le bas, dans 2% d'agarose à bas point de

fusion, recouvert de Fish Water contenant 300 μM de bromure de pancuronium. Une électrode en verre (5–6 $\text{M}\Omega$) remplie de liquide céphalo-rachidien artificiel composé de 10 mM HEPES, 134 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 2,1 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgCl_2 , 10 mM glucose; pH 7,8, a été placé dans le neuropile gauche du tectum optique des embryons. Les enregistrements ont été effectués pendant 1 h en mode current-clamp avec un intervalle d'échantillonnage de 10 μs et un filtre passe-haut de 0,1 Hz, un filtre passe-bas de 1 kHz et un gain numérique à 10 (amplificateur MultiClamp 700B, numériseur Digidata 1400, tous deux Molecular Devices). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Clampfit (Molecular Devices, San José, CA, USA). Les dépolarisations d'une intensité supérieure à -0,3 mV et durant plus de 100 ms ont été considérées comme des événements reflétant l'activité neuronale.

5. Étude de l'activité locomotrice

Les embryons de 4 jpf sont répartis individuellement dans une plaque de 96-puits dans 200 μL de Fish Water en fonction de leur génotype ou traitement. Cette plaque est ensuite placée dans un automate permettant l'enregistrement de l'activité locomotrice selon les paramètres de suivi des embryons sélectionnés dans le logiciel. La plaque est ensuite laissée pendant 30 minutes à l'obscurité dans la chambre d'enregistrement afin que les embryons s'habituent à leur nouvel environnement, mais aussi pour que le stress du transfert s'attenu. Après cette habituation, l'activité locomotrice des larves est enregistrée pendant 30 minutes, découpée en intervalles de 5 minutes. À la fin de l'enregistrement, le logiciel fournit la distance parcourue par chacun des embryons, leur vitesse de nage aux différents instants, une image du tracé des mouvements des embryons et leur vitesse, et cela pour chaque tranche de temps. Ces résultats sont ensuite analysés avec un script R personnalisé.

6. Marquage de la mort cellulaire

La visualisation de la mort cellulaire a été réalisée par deux méthodes différentes : l'une *in vivo* avec l'acridine orange, et l'autre *ex vivo* par l'immunomarquage de la forme activée de la protéine Caspase-3 (Atale et al. 2014).

6.1. L'acridine orange

L'acridine orange est un marqueur fluorescent *in vivo* de l'ADN fragmenté dans le cytoplasme des cellules en apoptose. Les embryons âgés de 4 jpf ont été incubés pendant 30 minutes dans une solution de 10 μM d'acridine orange (VectaCell) dilué dans de la Fish Water. Ils ont ensuite été lavés plusieurs fois rapidement dans de la Fish Water afin d'éliminer le

surplus d'acridine orange. Une fois bien lavés, les embryons ont été traités avec 300 μM de bromure de pancuronium pour les paralyser, puis inclus dans de l'agarose à basse température de fusion à 1,5% et orientés sur le dos au centre d'une chambre d'enregistrement. Une fois durcie, l'agarose est recouverte de Fish Water contenant de la tricaine. Le cerveau des embryons, d'une épaisseur d'environ 120 μM , est ensuite photographié en utilisant un microscope confocal à balayage laser Leica SP8 équipé avec un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Les images ont enfin été déconvoluées en utilisant le logiciel AutoQuant 3.1X (Media cybernetics) et les cellules marquées par l'acridine orange ont enfin été comptées sur ImageJ.

6.2. L'immuno-détection de la caspase-3 activée

L'activation de la Caspase-3 est un événement moléculaire caractéristique de l'apoptose et sa détection est une méthode classique d'étude de l'apoptose. Les embryons âgés de 4 jpf ont été fixés pendant 1h30 à température ambiante et avec agitation avec une solution de 4% de formaldéhyde diluée dans du PBS. Après plusieurs lavages avec du PBS, les embryons sont stockés à 4°C dans du PBS contenant 0,03% d'azide de sodium. Lorsque souhaité, le cerveau des embryons fixés est disséqué sous un stéréomicroscope puis sont stockés dans une solution de PBS contenant 0,1% de Triton X-100. Après plusieurs lavage avec cette solution, puis avec du PBS/1% triton/1% DMSO, les cerveaux sont bloqués puis perméabilisés pendant 30 minutes à température ambiante avec une solution contenant 1% DMSO, 2% Triton X-100 et 5% NGS dilués dans du PBS. Les anticorps primaires, des anticorps polyclonaux produits dans le lapin dirigés contre la Caspase-3 activée (Abcam, Ab44976, 1/500), sont ensuite dilués dans une solution du PBS/1% Triton X-100/1% DMSO et incubés avec les cerveaux pendant la nuit à 4°C et avec une agitation douce. Le lendemain matin, les anticorps primaires sont retirés et les cerveaux sont lavés avec une solution de PBS/0,1% Triton X-100. Puis les anticorps secondaires, des anticorps de chèvre anti-lapin et conjugués avec le fluorophore Alexa 488 (Molecular Probes, A-21206, 1/500), sont ensuite dilués dans une solution de PBS/1% Triton X-100/1% DMSO et incubés avec les cerveaux pendant 1h à température ambiante, à l'obscurité et avec une agitation douce. Les cerveaux sont ensuite lavés plusieurs fois avec du PBS/0,1% Triton X-100 puis inclus dans de l'agarose à bas point de fusion à 1% avant d'être imagé en utilisant un microscope confocal SP8 équipé avec un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Les images ont enfin été déconvoluées en utilisant le logiciel

AutoQuant 3.1X (Media cybernetics) et le nombre de cellules marquées a été déterminé avec le logiciel ImageJ.

7. Étude du profil inflammatoire

7.1. La RT-qPCR

Le cerveau des larves a été disséqué à 4 jpf, rassemblés par groupe de 10 puis congelé à -80°C dans du tampon de lyse. L'ARN a ensuite été isolé après broyage des cerveaux avec une seringue munie d'une aiguille de 26G (10 cerveaux par échantillon) en utilisant le kit RNA XS Plus (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'ADNc a ensuite été synthétisé en utilisant le kit de synthèse d'ADNc iScript™ (Bio-Rad, Munich, Allemagne), et la qPCR a été réalisée en utilisant le kit iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Les échantillons ont été réalisés en triple répliquat et les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'expression du gène *tpb*. Les amorces ont été synthétisées par Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne).

<i>il-1β</i>	Sens	5'-CTT AAC CAG CTC TGA AAT GAT G-3'
	Anti-sens	5'-TGT CGC ATC TGT AGC TCA TTG-3'
<i>il-8</i>	Sens	5'-TGA CCA TCA TTG AAG GAA TGA G-3'
	Anti-sens	5'-CAT CAA GGT GGC AAT GAT CTC-3'
<i>il-4</i>	Sens	5'-GAG ACA GGA CAC TAC TCT AAG-3'
	Anti-sens	5'-GTT TCC AGT CCC GGT ATA TG-3'
<i>il-10</i>	Sens	5'-AAC GAG ATC CTG CAT TTC TAC-3'
	Anti-sens	5'-CCT CTT GCA TTT CAC CAT AT-3'
<i>tgf-β3</i>	Sens	5'-AAA ACG CCA GCA ACC TGT TC-3'
	Anti-sens	5'-CCT CAA CGT CCA TCC CTC TG-3'
<i>tpb</i>	Sens	5'-GTG CAC AGG AGC CAA AAG TG-3'
	Anti-sens	5'-GTT CAT AGC TGC TAA ACT GCT G-3'

7.2. Il-1β

Les poissons de la lignée Tg[mpeg1:mcherryF] ont été croisés avec ceux de la lignée Tg[il-1β:GFP] afin d'étudier l'expression de la protéine Il-1β par les cellules microgliales. Les embryons issus de ce croisement ont été paralysés avec 300 μM de bromure de pancuronium, puis inclus dans de l'agarose à basse température de fusion à 1,5% et orientés sur le dos au centre d'une chambre d'enregistrement. Une fois durcie, l'agarose est recouverte de Fish Water contenant de la tricaine. Le cerveau des embryons, d'une épaisseur d'environ 120 μM, est ensuite photographié en utilisant un microscope confocal Leica SP8 équipé avec un objectif

20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Les images ont ensuite été déconvoluées en utilisant le logiciel AutoQuant 3.1X (Media cybernetics) et le nombre total de cellules microgliales ainsi que celui de la sous population expriment la GFP ont été dénombrés en utilisant le logiciel ImageJ.

8. Étude de la distribution des synapses excitatrices

Les embryons âgés de 4 jpf sont fixés avec du formaldéhyde à 4% pendant 1 h 30 min à température ambiante puis conservés à 4°C dans du PBS contenant 0,03% d'azide de sodium. Les embryons fixés sont ensuite transférés dans une solution de 15% de saccharose à 4°C pendant la nuit, puis inclus le lendemain dans un milieu de montage contenant 7,5% de gélatine et 15% de saccharose, puis congelés instantanément à -45°C dans de l'isopentane avant d'être stockés à -80°C. Lorsque nécessaire, les embryons congelés sont coupés en sections de 20 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont montées sur des lames Superfrost et conservées à -20°C jusqu'à l'immunomarquage. Les coupes sont d'abord lavées plusieurs fois avec du PBS jusqu'à enlever totalement l'excès de gélatine, puis incubées avec une solution d'avidine pendant 10 minutes afin de bloquer la biotine endogène. L'excès d'avidine est éliminé par un lavage dans une solution de biotine. Les coupes sont ensuite bloquées et perméabilisées avec une solution de 0,2% gélatine/0,25% Triton X-100/10% NGS/2% BSA dilué dans du PBS. Les anticorps primaires, des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine PSD95 (souris) (Abcam, Ab18258, 1/200), sont dilués dans du PBS/0,2% gélatine/0,25% Triton X-100 puis déposés sur les coupes pendant la nuit à température ambiante. Le lendemain, les lames sont lavées plusieurs fois avec du PBS/0,2% gélatine/0,25% Triton X-100 puis incubées avec un anticorps biotinylé de chèvre anti-lapin (Molecular Probes, A-21206, 1/500). Après 1 h d'incubation, les coupes sont lavées puis incubées pendant 30 min à l'obscurité avec un complexe streptavidine/Alexa 488, afin d'amplifier le signal. Le complexe est ensuite éliminé, les coupes sont lavées puis finalement colorées à l'obscurité pendant 10 minutes avec 0,3% de DAPI. Après un dernier lavage, les coupes sont montées avec le milieu Fluoromount et conservées à 4°C dans l'obscurité. Quand souhaité, les coupes sont photographiées en utilisant un microscope confocal Leica SP8 équipé d'un objectif 63x/huile d'une ouverture numérique de 1,4. Les neuropiles du tectum optique ont été photographiés à pleine résolution du fait de la finesse du marquage : un volume de pixel de 0,063 × 0,063 × 0,4 µm. Les images acquises ont ensuite été déconvoluées

à l'aide du logiciel AutoQuant (Media Cybernetics). Les *puncta* de PSD-95 ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ à l'aide d'une macro semi-automatisée (communication personnelle de Zolt Csaba; Inserm UMR1141) qui applique un seuil d'intensité de la fluorescence pour sélectionner les signaux spécifiques et segmenter l'image. Puis les *puncta* ayant une aire comprise entre $0,018 \mu\text{m}^2$ et $3,14 \mu\text{m}^2$ ont été sélectionnés. Le nombre total de *puncta* de PSD-95 a finalement été divisé par la surface du neuropile pour obtenir la densité du signal de PSD-95.

9. Observation des cellules microgliales

Les embryons âgés de 4 jpf issus de la lignée transgénique Tg[mpeg1:mcherryF] ont été paralysés avec $300 \mu\text{M}$ de bromure de pancuronium puis immobilisés dans de l'agarose à bas point de fusion, orienté sur le dos, au centre d'une chambre d'enregistrement, avant d'être photographiés.

9.1. Étude de leur morphologie

Le tectum optique du cerveau des embryons a été photographié à la résolution 1024×1024 pixels avec un microscope confocal à balayage laser Leica SP8, équipé d'un objectif à $20\times$ /eau d'une ouverture numérique de 0,75. Enfin, les images ont été reconstruites grâce au logiciel Imaris (Bitplane) et la surface, le volume et la sphéricité des cellules microgliales ont été quantifiées à l'aide du module MeasurementPro (Bitplane), puis le nombre de processus microgliaux, leur longueur, ainsi que l'analyse de Sholl ont été quantifiés à l'aide du module Filament Tracer (Bitplane).

L'analyse par cluster a été réalisée en utilisant les quantifications de la sphéricité (S), du nombre de prolongements (NP), de la longueur totale (TL) et moyenne (ML) des prolongements, ainsi que de la surface (A) et du volume (V) des cellules microgliales. Dans notre analyse, les cellules microgliales présentant au moins trois des caractéristiques suivantes; une sphéricité inférieure à 0,5, un nombre de prolongements supérieur à 7, une longueur totale des prolongements supérieure à $140 \mu\text{m}$, une longueur moyenne des prolongements supérieure à $24 \mu\text{m}$ et une surface supérieure à $2400 \mu\text{m}^2$, ont été considérées comme des microglies dites « ramifiées » et homéostatiques. A l'inverse, les cellules microgliales présentant au moins trois des caractéristiques suivantes; une sphéricité supérieure à 0,7, un nombre de prolongements inférieur à 3, une longueur totale des prolongements inférieure à $60 \mu\text{m}$, une longueur moyenne des prolongements inférieure à 17

μm et une surface inférieure à $1500 \mu\text{m}^2$; ont été considérées comme des microglies dites « amiboïdes » et activées. Les cellules microgliales présentant moins de 3 des caractéristiques précédemment définies, ont été considérées comme des microglies dites « transitionnelles ».

9.2. Étude de leur dynamique

Des hémisphères du tectum optique de $42 \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été imagés à la résolution 1024×512 pixels pendant 1h avec un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 40x/eau d'une ouverture numérique de 1,1. Le déplacement du corps cellulaire des microglies, la distance parcourue entre la première et la dernière image et la vitesse du déplacement des microglies ont été quantifiés en utilisant le logiciel Imaris MeasurementPro (Bitplane).

10. Analyse des données, graphique et statistiques

Toutes les données sont issues d'au moins trois expériences indépendantes et ont été analysées sur R avec des scripts personnalisés. La répartition normale des données a été testée par le test de Shapiro-Wilk. L'égalité des variances a été contrôlée par un test de Levene. Les moyennes ont été comparées par des tests de Mann-Whitney et des t-test de Student, avec ou sans la correction de Welch, en fonction des résultats des tests de normalité et d'égalité des variances. Les graphiques ont aussi été réalisés avec R et montrent la moyenne des résultats \pm l'écart type à la moyenne.

CHAPITRE III : *RÉSULTATS*

Avant-Propos

Mon travail de thèse fut très majoritairement centré sur l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant dans les embryons *scn1Lab*-KD, modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre. L'étude de ces embryons a conduit à la publication d'un article en 2019, ainsi qu'à deux autres articles en préparation.

L'**article 1** est central dans ma thèse. Il montre notamment la corrélation entre les enregistrements électriques et calciques des neurones, ainsi que les défauts de la balance excitation/inhibition dans les embryons *scn1Lab* et les conséquences de l'hyperexcitabilité neuronales sur la survie des cellules cérébrales. J'y ai réalisé la grande majorité des expériences, même si j'ai bénéficié de l'aide de collaborateurs pour me former aux enregistrements électrophysiologiques et de stagiaires pour la réalisation des immunohistochimies.

L'**article 2** se concentre sur l'étude du comportement des cellules microgliales dans le contexte de l'hyperexcitabilité neuronale des embryons *scn1Lab*-KD. Il montre que cette hyperexcitation provoque une activation partielle des microglies associée à une légère neuroinflammation. Il montre aussi le rôle neuro-protecteur des microglies sur les neurones hyperexcités. J'y ai réalisé la quasi-totalité des expériences, même si j'ai bénéficié, là aussi, de l'aide de stagiaires pour la réalisation des immunohistochimies.

L'**article 3** étudie les effets du traitement des embryons *scn1Lab*-KD à la carbétocine, un agoniste de l'ocytocine. Il montre que la carbétocine permet de réduire les phénotypes épileptiformes des embryons *scn1Lab*-KD, constituant ainsi une nouvelle stratégie thérapeutique pour les épilepsies. J'y ai réalisé la totalité des expériences.

L'**article 4** constitue le développement d'un modèle d'empoisonnement à un organophosphoré et l'étude des modifications cérébrales associées. Il montre que l'exposition des larves au diisopropylfluorophosphate permet de modéliser les caractéristiques principales d'un empoisonnement aux organophosphorés. J'y ai réalisé l'étude de l'activité locomotrice, l'enregistrement et l'analyse de l'activité neuronale par imagerie calcique, le marquage de la mort neuronale et la quantification associée. Les autres expériences ont été réalisées par des collaborateurs ou par une autre doctorante de l'équipe.

Premier article. “Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome”

Alexandre Brenet, Rahma Hassan-Abdi, Julie Somkhit, Constantin Yanicostas, & Nadia Soussi-Yanicostas




Publié le 5 Novembre 2020 dans le journal **Cells** (IF : 4,336)
doi : 10.3390/cells8101199

Résumé de l'article

Le syndrome de Dravet est une épilepsie grave du très jeune enfant qui est associée à des troubles du comportement, des déficits moteurs et intellectuels, ainsi qu'à une forte mortalité. Les modifications cellulaires et moléculaires donnant lieu à l'apparition des crises d'épilepsies dans ce syndrome sont peu étudiées. C'est pourquoi nous avons utilisé le poisson zèbre pour modéliser cette maladie et ainsi, étudier les conséquences neurodéveloppementales de la maladie. Ce travail nous a permis de montrer que l'inactivation du gène *scn1Lab* induit une augmentation des influx calciques au sein des neurones, démontrant alors la corrélation qui existe entre ces signaux et l'activité électrique des neurones. Cette étude souligne ainsi l'intérêt de l'imagerie calcique pour l'étude spatiale et temporelle de l'activité neuronale dans les modèles génétique d'épilepsie chez le poisson zèbre. En effet, cette technique permet d'observer en temps réel l'activité neuronale à l'échelle cellulaire et, ainsi, de mieux étudier la propagation des crises d'épilepsie au cours de la maladie. En plus de cette nouvelle approche pour l'étude des crises d'épilepsie, nos résultats ont mis en lumière les modifications biologiques induites par l'inactivation du gène *scn1Lab*. En effet, nos travaux montrent que les embryons *scn1Lab*-KD développent un défaut de la balance excitation/inhibition en faveur de l'excitation. Ce défaut se met en place progressivement et pourrait être causé par la perte des neurones inhibiteurs au cours du développement des embryons. Cette perte spécifique serait une conséquence directe de l'inactivation du gène *scn1Lab* entraînant un mauvais fonctionnement des interneurons GABAergiques, lesquels seraient alors éliminés. Cette diminution des neurones inhibiteurs induirait alors un défaut au niveau synaptique avec une diminution de la densité des synapses inhibitrices. Ces observations mettent ainsi en lumière les changements qui se déroulent au sein du cerveau des embryons soumis aux perturbations associées au syndrome de Dravet, ouvrant ainsi la porte à de potentielles nouvelles voies thérapeutiques.

Article

Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome

Alexandre Brenet , Rahma Hassan-Abdi, Julie Somkhit , Constantin Yanicostas and Nadia Soussi-Yanicostas * 

Université de Paris, NeuroDiderot, Inserm, F-75019 Paris, France; alexandre.brenet@inserm.fr (A.B.); rahma-hassan.abdi@inserm.fr (R.H.-A.); julie.somkhit@inserm.fr (J.S.); constantin.yanicostas@inserm.fr (C.Y.)

* Correspondence: nadia.soussi@inserm.fr; Tel.: +00-33140-03-1931

Received: 13 August 2019; Accepted: 3 October 2019; Published: 4 October 2019



Abstract: Dravet syndrome is a type of severe childhood epilepsy that responds poorly to current anti-epileptic drugs. In recent years, zebrafish disease models with *Scn1Lab* sodium channel deficiency have been generated to seek novel anti-epileptic drug candidates, some of which are currently undergoing clinical trials. However, the spectrum of neuronal deficits observed following *Scn1Lab* depletion in zebrafish larvae has not yet been fully explored. To fill this gap and gain a better understanding of the mechanisms underlying neuron hyperexcitation in *Scn1Lab*-depleted larvae, we analyzed neuron activity in vivo using combined local field potential recording and transient calcium uptake imaging, studied the distribution of excitatory and inhibitory synapses and neurons as well as investigated neuron apoptosis. We found that *Scn1Lab*-depleted larvae displayed recurrent epileptiform seizure events, associating massive synchronous calcium uptakes and ictal-like local field potential bursts. *Scn1Lab*-depletion also caused a dramatic shift in the neuronal and synaptic balance toward excitation and increased neuronal death. Our results thus provide in vivo evidence suggesting that *Scn1Lab* loss of function causes neuron hyperexcitation as the result of disturbed synaptic balance and increased neuronal apoptosis.

Keywords: Dravet syndrome; Calcium imaging; Local field potential; Excitatory/inhibitory balance; Apoptosis; In vivo imaging; Zebrafish; *scn1Lab*; Morpholino *scn1Lab*^{AUG}

1. Introduction

Dravet syndrome (DS) is a type of severe drug-resistant childhood epilepsy. It is associated with several comorbidities, including intellectual disability, irreversible psychomotor deficits, behavioral disorders, and high mortality at around 10 years of age [1,2]. DS is a genetic disease, caused in 80% of cases by de novo loss of function mutations in the *SCN1A* gene encoding the alpha-1 subunit of the main voltage-dependent sodium channel in inhibitory interneurons [3], whose synapses mainly release GABA, a neurotransmitter that inhibits excitation of post-synaptic neurons [4].

Among animal models that have been developed in recent years, the zebrafish has proved to be a versatile and powerful system for in vivo epilepsy research [5–7]. In particular, zebrafish larvae with loss of function of the *scn1Lab* gene, one of the two zebrafish orthologs of *SCN1A*, have already been used as animal models to find novel antiepileptic drug candidates, several of which are now undergoing clinical trials [8–10].

However, while *Scn1Lab*-depleted larvae have been established as a bona fide epilepsy model [7–15], the spectrum of neuronal deficits induced by the loss of function of this sodium channel has not yet been fully explored. To fill this gap, we first combined transient calcium uptake imaging

and local field potential recording to analyze neuron hyperactivity at whole brain levels in real time. In *Scn1Lab*-depleted larvae, we observed recurrent events associating massive synchronous calcium uptakes and ictal-like local field potential bursts characteristic of epileptiform seizures. Importantly, we also observed that these larvae displayed a marked deficit in the number of inhibitory synapses, together with a dramatic over-accumulation of excitatory ones, heavily disrupting the synaptic balance, which was correlated with a shift in the neuronal population toward excitatory neurons. Last, we observed that loss of function of this sodium channel caused increased neuronal apoptosis. Taken together, our findings are evidence that *Scn1Lab*-depletion causes epileptiform seizures as a result of brain development defects that include impaired synaptic balance and increased neuronal death.

2. Materials and Methods

2.1. Fish Maintenance and Transgenic Lines

Adult zebrafish were raised at 26.5 °C in standard aquaculture conditions with a 14 h light/10 h dark cycle. Embryos collected by natural spawning were raised in E3 medium complemented with 0.002% methylene blue and kept at 28.5 °C. 0.003% phenylthiourea (PTU; Sigma) was added at 1 day post-fertilization (dpf) to inhibit pigmentation. The mutant *scn1Lab* (*didy*^{S552}) was a gift from Dr. Scott Baraban (University of California, San Francisco, USA), the HuC:GCaMP5G transgenic line was a gift from Dr. George Debrégeas (Laboratoire Jean Perrin, Paris) and the *Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed* double transgenic line was a gift from Dr Germán Sumbre (IBENS, Paris).

All the animal experiments described in the present study were conducted at the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm), and were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

2.2. Morpholino

Antisense morpholino-oligonucleotide (MO) (5'-CTGAGCAGCCATATTGACATCCTGC-3'), obtained from Gene Tools, was used to block the *scn1Lab* zebrafish mRNA translation. One- to two-cell embryos were injected with 1 pmol MO *scn1Lab*^{AUG}, 0.53 ng rhodamine B dextran and 0.1 mM KCl.

2.3. Locomotor Activity

Larvae locomotor activity (i.e., movement) was evaluated using the Zebrabox, an infrared automated recording and tracking device supported by ZebraLab software (Viewpoint, Lyon, France). Each 96-well plate containing 4 dpf control, morphant or mutant larvae in 200 µL E3 medium was placed in the Zebrabox recording chamber. In all locomotion recording protocols, animal color was set to dark and detection threshold to 15. After 45 min habituation in darkness, larvae were simultaneously tracked for 25 min. Larvae movement in each well was computed as the sum of all pixels for which intensity changed during the recording, and plotted as "acting units".

2.4. Calcium Imaging

4 dpf zebrafish larvae were paralyzed using 300 µM pancuronium bromide (PB, Sigma) and immobilized dorsal-side down at the center of a recording chamber in 1.2% low-melting agarose covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 300 µM PB. The chamber was then placed on an inverted a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. Calcium uptake events were detected by recording the fluorescence of a 512 × 512-pixel image of a single focal plane at 2 Hz for 1 h. Fluorescence intensity of the optic tectum was measured using ImageJ software. Fluorescence variations ($\Delta F/F_0$) were calculated by subtracting the mean fluorescence intensity of all frames and normalizing the mean fluorescence intensity of all frames.

The fluorescence drift over time was corrected by subtracting the mean value of the lowest values (all values under the median) within a 20 s sliding window around the point. All fluorescence increases greater than $0.04 \Delta F/F_0$ were considered as calcium events. Since the detection system may detect false events, all of them were manually checked.

2.5. Local Field Potential Recording

4 dpf zebrafish larvae were paralyzed using 300 μ M PB and immobilized, ventral-side down, in 2% low-melting agarose covered with E3 medium containing 300 μ M PB. A glass electrode (5–6 M Ω) filled with artificial cerebrospinal fluid composed of 10 mM HEPES, 134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 2.1 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM glucose; pH 7.8, was placed in the left neuropil of the optic tectum of the larva. The recordings were performed for 1 h in a current clamp mode at 10 μ s sampling interval and with a 0.1 Hz high-pass filter, 1 kHz low-pass filter and digital gain at 10 (MultiClamp 700B amplifier, Digidata 1400 digitizer, both Molecular Devices). Results were analyzed with the Clampfit software (Molecular Devices, San José, CA, USA). Events were defined as every downward membrane potential variation under -0.3 mV amplitude and lasting more than 100 ms.

2.6. Synapse Immunostaining

4 dpf control and morphant larvae were fixed with 4% formaldehyde for 1 h 30 min at room temperature and stored at 4 °C in PBS containing 0.02% sodium azide. Fixed larvae were transferred to 15% sucrose at 4 °C overnight and then embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose, flash frozen in isopentane at -45 °C and stored at -80 °C. When needed, frozen embedded larvae were cut into 20 μ m thick sections using a cryostat, mounted on Superfrost slides and stored at -20 °C until immunostaining. For gephyrin, larvae were not fixed, but transferred in 15% sucrose for 1 h at room temperature, anesthetized with 0.01% tricaine and embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose. 20- μ m-thick sections were post-fixed for 10 min with 4% formaldehyde and treated with 0.25% trypsin diluted in PBS for 2 min. Immunostaining was performed as follows. Sections were washed three times with PBS, blocked and permeabilized with 0.2% gelatin/0.25% Triton diluted in PBS. Rabbit antibody anti-PSD-95 (Abcam, Ab18258, 1:200), an excitatory post-synaptic protein, or rabbit antibody anti-gephyrin (Abcam, Ab185993, 1:100), an inhibitory post-synaptic protein, were added onto the sections, which were incubated overnight at room temperature. Sections were washed several times and incubated with anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated antibody (Molecular Probes, A-21206, 1:500), in the dark at room temperature. After 1 h incubation, sections were washed and stained in the dark for 10 min with 0.3% DAPI. After a last wash, sections were mounted in Fluoromount medium and conserved at 4 °C in the dark. Sections were imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 40x/oil 1.3 objective. Optic tectum and telencephalon regions were captured at full resolution, 0.063 \times 0.063 \times 0.4 μ m voxel size. Images were deconvoluted using AutoQuant (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) software and processed using ImageJ software. PSD-95 and gephyrin puncta were quantified using a semi-automated macro (Zsolt Csaba; Inserm UMR1141), which applied a threshold to segment the image and select only the puncta ranging between 0.018 μ m² and 3.14 μ m². The total number of PSD-95 or gephyrin puncta was finally divided by the surface area of interest to obtain the density of PSD-95 and gephyrin signal in the optic tectum. All manual cell counts were performed blind.

2.7. Identification and Counting of Inhibitory and Excitatory Neurons

3, 4 and 5 dpf larvae were anesthetized using 0.01% tricaine and embedded in 1.2% low-melting agarose, ventral-side down, in a recording chamber covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 0.01% tricaine. The chamber was then placed under a Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope equipped with a WPApo 20x/1.0 objective. 52 slices spanning approximately 100 μ m were captured and processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Gad1b and Vglut2a positive neurons in the optic tectum were counted using Imaris MeasurementPro8.4.2

(Bitplane, Zurich, Switzerland). Briefly, neurons were approximated as 7- μ m-diameter spheres and sorted by their fluorescence intensity.

2.8. Neuronal Death

Neuronal death was detected in living zebrafish brains using acridine orange (AO), which binds to free nucleic acid. 4 dpf control and *scn1Lab* larvae were incubated for 20 min with 10 μ M AO (VectaCell) in E3 medium. Larvae were washed several times, paralyzed with 300 μ M PB and embedded in 1.1% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottom dish, covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 300 μ M PB. 100 μ m brain stacks were acquired using a Leica SP8 laser confocal scanning microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. In addition, 4 dpf control and morphant brains were dissected, fixed with 4% formaldehyde and stained with activated caspase-3 antibody. The brains were first washed with 0.1% triton in PBS, then permeabilized and blocked with 5% goat serum/1% Triton in PBS. Rabbit polyclonal antibody to activated caspase-3 (Abcam, Ab44976, 1:500) was added, which was incubated overnight at room temperature. Brains were washed several times and incubated with an anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated antibody (Molecular Probes, A-21206 1:500), for 1 h at room temperature in the dark. Brains were finally washed, embedded in 1.1% agarose in the center of a 35 mm glass-bottom dish and imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. All images were processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) and ImageJ software.

2.9. Colocalization of Activated Caspase-3 Labeling with Inhibitory or Excitatory Neurons

4 dpf Tg[Gad1:GFP; Vglut2a:DsRed] larval brains were stained using activated caspase-3 antibody followed by anti-rabbit IgG Cy5 conjugated antibody (Molecular Probes, A-10523,1:300) and imaged as previously described. Images were processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Colocalization of activated caspase-3 signals with Gad1b or Vglut2a positive neurons was assessed manually using ImageJ software.

2.10. Z-VAD Treatment

3 dpf control and *scn1Lab* larvae were incubated for 24 h with either vehicle or 300 μ M Z-VAD-fmk (Sigma), in E3 medium containing 1% dimethyl sulfoxide (DMSO). Dead cells were then labeled using AO and imaged as previously described.

2.11. Statistics

Data were plotted and analyzed using GraphPad Prism 5. Data were checked for normality using the d'Agostino and Pearson omnibus normality test with alpha set at 0.05. Data that did not follow a normal distribution were compared with a Mann-Whitney test. Data that followed a normal distribution were analyzed with Student's two-tailed unpaired *t*-test with or without Welch's correction depending on the variance difference of each sample. Graphs show the mean and the SEM.

3. Results

3.1. Calcium Imaging Combined with LFP Recordings as Tools to Analyze Neuronal Activity in Vivo in *Scn1Lab*-Depleted Zebrafish Larvae

As previously described, zebrafish embryos injected with 1 pmol *scn1Lab*^{AUG} morpholino-oligonucleotide, hereafter referred to as *scn1Lab* morphants, and *scn1Lab*^{552/s552} mutants displayed several highly penetrant phenotypes, including black appearance resulting from defective pigment aggregation, failure to inflate their swim bladder, and, from 4 dpf onward, recurrent spontaneous epileptiform seizures, reflected by a markedly increased swimming activity of the larvae [8,10], (Figure S1). Importantly, since phenotypes observed in *scn1Lab* morphants (*N* = 904), and particularly seizure number and intensity, were the same as those seen in *scn1Lab*^{552/s552} mutants

($N = 192$), we decided to use the former to further characterize the neuronal phenotypes associated with loss of *Scn1Lab* function.

First, to confirm that the increased swimming activity observed in 4 dpf *scn1Lab* morphants did correspond to bona fide epileptic seizures caused by the synchronous hyperexcitation of large neuron populations, we generated zebrafish *scn1Lab* morphants that also carried the Tg[HuC:GCaMP5G] transgene encoding a calcium-dependent fluorescent protein expressed under the control of the pan-neuronal HuC promoter [16]. To record transient calcium uptakes associated with neuron hyperexcitation during epileptiform seizures, we imaged the optic tectum of pancuronium-paralyzed and agarose-immobilized 4 dpf larvae and simultaneously recorded forebrain local field potentials (LFPs) (Figure 1A). Results show that *scn1Lab*^{AUG} morphants displayed recurrent spontaneous transient calcium uptake events, events with $\Delta F/F_0 > 0.04$, (Figure 1E, F; $p < 0.001$) that also precisely corresponded to multi-spike ictal-like discharges (correlation coefficient $R^2 = 0.772$) (Figure 1G,H), which were never seen in either non-injected larvae or control morphants (Figure 1D) (Figure S2). Thus, in good agreement with previous results [8,10], 4 dpf *Scn1Lab*-depleted zebrafish larvae displayed epileptiform seizures, which could be detected in vivo by both calcium imaging techniques and LFP recordings.

3.2. Inhibitory/Excitatory Synaptic Balance is Disrupted in *Scn1Lab*-Depleted Larvae

Harmonious functioning of neuron networks relies on a finely tuned balance between excitatory and inhibitory inputs [17]. Synapses, which are essential components of this balance, comprise both excitatory and inhibitory subunits that release glutamate and GABA, respectively [18]. This balance is impaired in neurological disorders such as epilepsy in which large populations of neurons display synchronous hyperexcitation [19,20]. We recently showed that zebrafish *gabra1*^{-/-} and *depdc5*^{-/-} epileptic mutants displayed markedly fewer inhibitory synapses compared to age-matched control larvae, showing that these two mutants display brain development defects [21,22]. To determine whether *Scn1Lab* deficiency also induced unbalanced excitatory/inhibitory post-synaptic outputs, we analyzed and compared, by immunocytochemistry, the distribution of the two post-synaptic populations on brain sections of 5 dpf control and *Scn1Lab*-depleted larvae, using anti-PSD-95 and anti-gephyrin antibodies, which label excitatory and inhibitory post-synaptic terminals, respectively [23]. Quantification of the two post-synaptic populations showed a marked increase in PSD-95 labeling (Figure 2B,C; $p < 0.01$) combined with a clear decrease of that of gephyrin (Figure 1E,F; $p < 0.01$), in *scn1Lab*^{AUG} morphants, compared to controls (Figure 2A,D). These data clearly show that depletion of *Scn1Lab* causes a marked disruption of the synaptic balance, which is shifted toward excitation (Figure 2G; $p < 0.01$).

3.3. Distribution of Excitatory and Inhibitory Neurons in *scn1Lab* Model

We next assessed whether the defective excitatory/inhibitory synaptic balance seen in *Scn1Lab*-depleted larvae could be related to an abnormal ratio of inhibitory and excitatory neurons. To test this hypothesis, we used the double transgenic line Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] that labels inhibitory neurons with GFP and excitatory neurons with DsRed [24,25] as recipient line to generate *scn1Lab*^{AUG} morphants (Figure 3). First, live imaging combined with quantitative image analysis revealed that the total number of neurons is significantly decreased in *scn1Lab*^{AUG} morphants at 3 dpf (Figure 3D; $p < 0.05$), 4 dpf (Figure 3G; $p < 0.001$) and 5 dpf (Figure 3J; $p < 0.01$) when compared to age-matched controls. Next, we quantified the number of inhibitory (GFP⁺) and excitatory (DsRed⁺) neurons at 3, 4 and 5 dpf in *scn1Lab*^{AUG} morphants and controls. Our results show that at 3 dpf, the percentage of excitatory and inhibitory neurons was similar in *Scn1Lab*-depleted and control larvae (Figure 3K). By contrast, the ratio of excitatory to inhibitory neurons was markedly increased at 4 dpf (Figure 3L; $p < 0.001$) and 5 dpf (Figure 3M; $p < 0.01$). It is of note that the ratio of excitatory to inhibitory neurons did not change in control embryos between 3 and 5 dpf (Figure 3K,L,M).

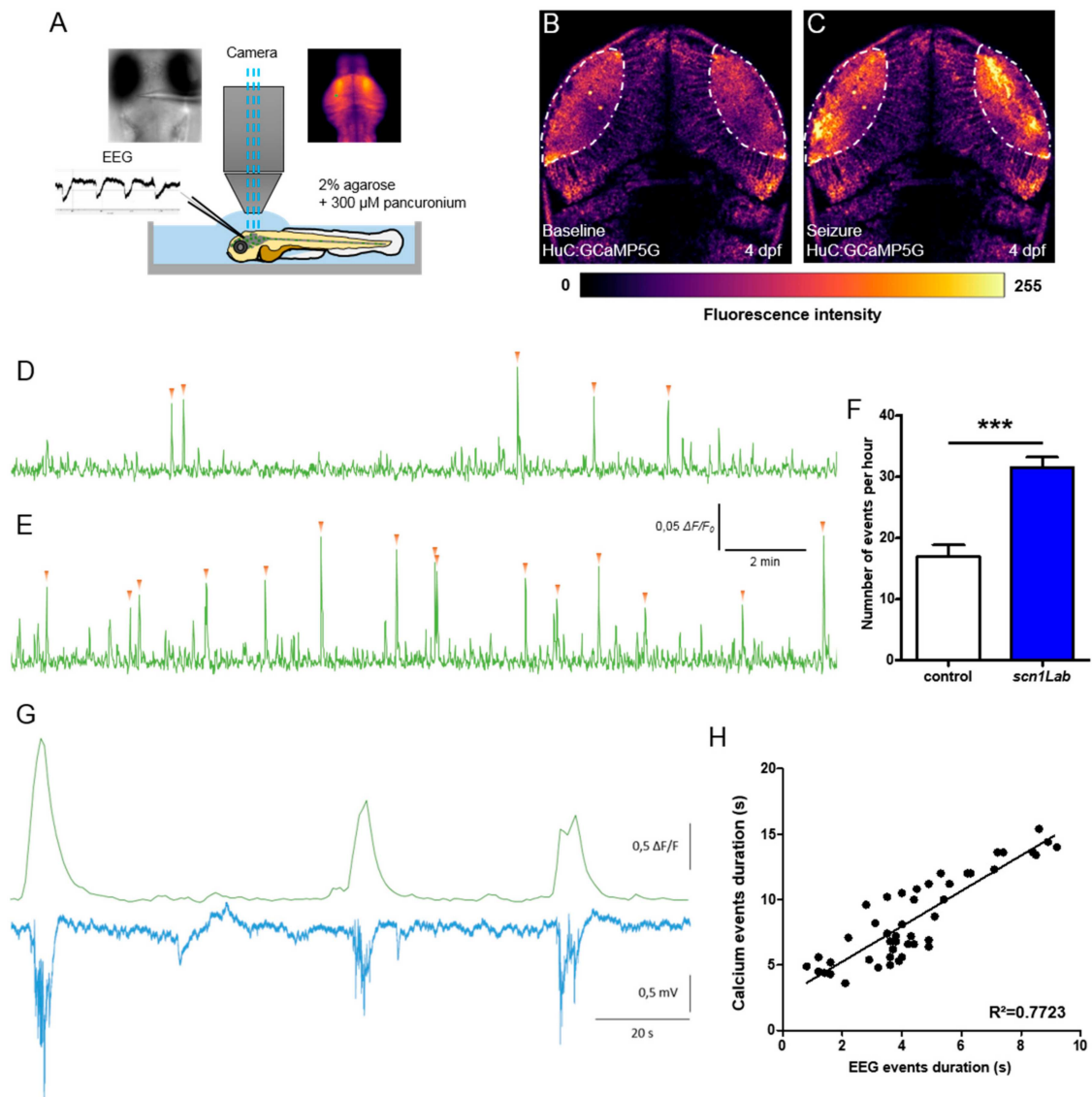


Figure 1. Correlation between LFP and calcium activity in *scn1Lab* model. (A) Schematic of the experimental setup to simultaneously record local field potential and calcium activity of a larval zebrafish brain. (B,C) Calcium images showing respectively the baseline activity (B) and the seizure activity (C). The fluorescence intensity is color-coded as shown in the color bar below the images. (D,E) Representative 20 min calcium recording of immobilized and paralyzed 4 dpf control (D) ($N = 9$) and *scn1Lab* (E) ($N = 9$) larvae. Each calcium event is shown with an orange arrowhead. (F) Number of events, calcium increases greater than $0.04 \Delta F/F_0$ amplitude, during 1 h recording. (G) Representative LFP, recorded in the left neuropil of the optic tectum, and calcium traces, from the optic tectum, of a paralyzed and immobilized 4 dpf *scn1Lab* larva. (H) Correlation between LFP and calcium events duration ($n = 46$). $N =$ number of larvae and $n =$ number of events. Error bars on all graphs represent standard error of the mean (SEM). ***, $p < 0.001$. p -value was determined using Student's unpaired t -test.

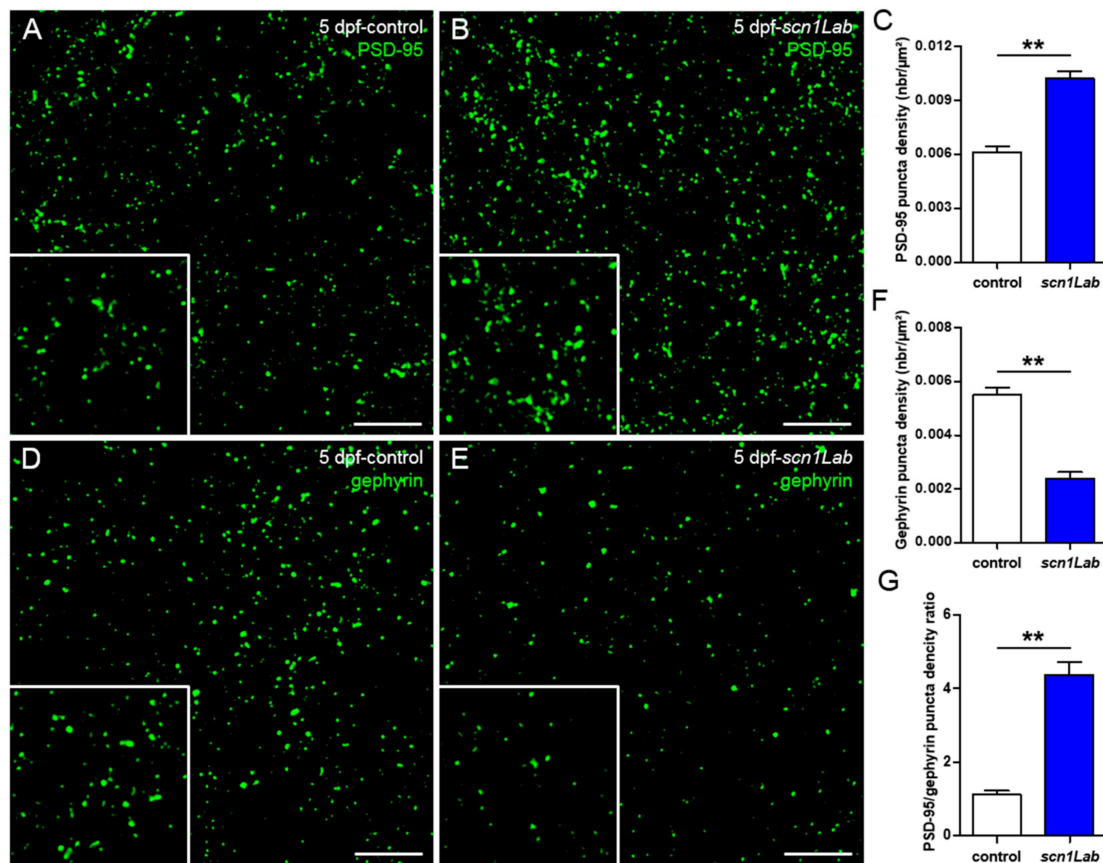


Figure 2. Defects of excitatory/inhibitory balance in the *Scn1Lab*-depleted larvae. (A,B) 20 μm coronal sections of 5 dpf control (A) ($N = 5, n = 15$) and *scn1Lab* (B) ($N = 5, n = 15$) larvae stained with PSD-95, an excitatory post-synaptic scaffolding protein. (D,E) 20 μm coronal sections of 5 dpf control (D) ($N = 5, n = 20$) and *scn1Lab* (E) ($N = 5, n = 19$) larvae stained with gephyrin, an inhibitory post-synaptic scaffolding protein. Images were acquired with a SP8 Leica laser scanning confocal microscope equipped with a 40x/oil 1.3 objective. Scale bar 5 μm . (C,F) Quantification of PSD-95 (C) and gephyrin (F) puncta density. (G) PSD-95/gephyrin puncta density ratio. $N =$ number of larvae and $n =$ number of sections. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). **, $p < 0.01$. p -values were determined using the Mann-Whitney test.

3.4. Increased Neuron Apoptosis in *Scn1Lab*-Depleted Larvae

A large body of data gained from the analysis of neuronal tissues from human epileptic patients and animal epilepsy models clearly indicates that both brief and prolonged seizures cause neuron death through activation of both apoptosis and autophagy signaling pathways [26–28]. We therefore investigated whether *Scn1Lab* depletion induced increased neuron apoptosis. We first used *in vivo* labeling with acridine orange. Results showed that the number of apoptotic cells was markedly increased in *scn1Lab*^{AUG} morphants compared to control larvae (Figure 4A,B,D; $p < 0.001$). To confirm this result, we also visualized neuron apoptosis using immunocytochemistry and anti-activated caspase-3 antibody. In good agreement with acridine orange staining, a significant increase in the number of activated caspase-3 positive cells were observed in the brain of *Scn1Lab*-depleted individuals compared to control larvae (Figure 4E,F,G; $p < 0.001$).

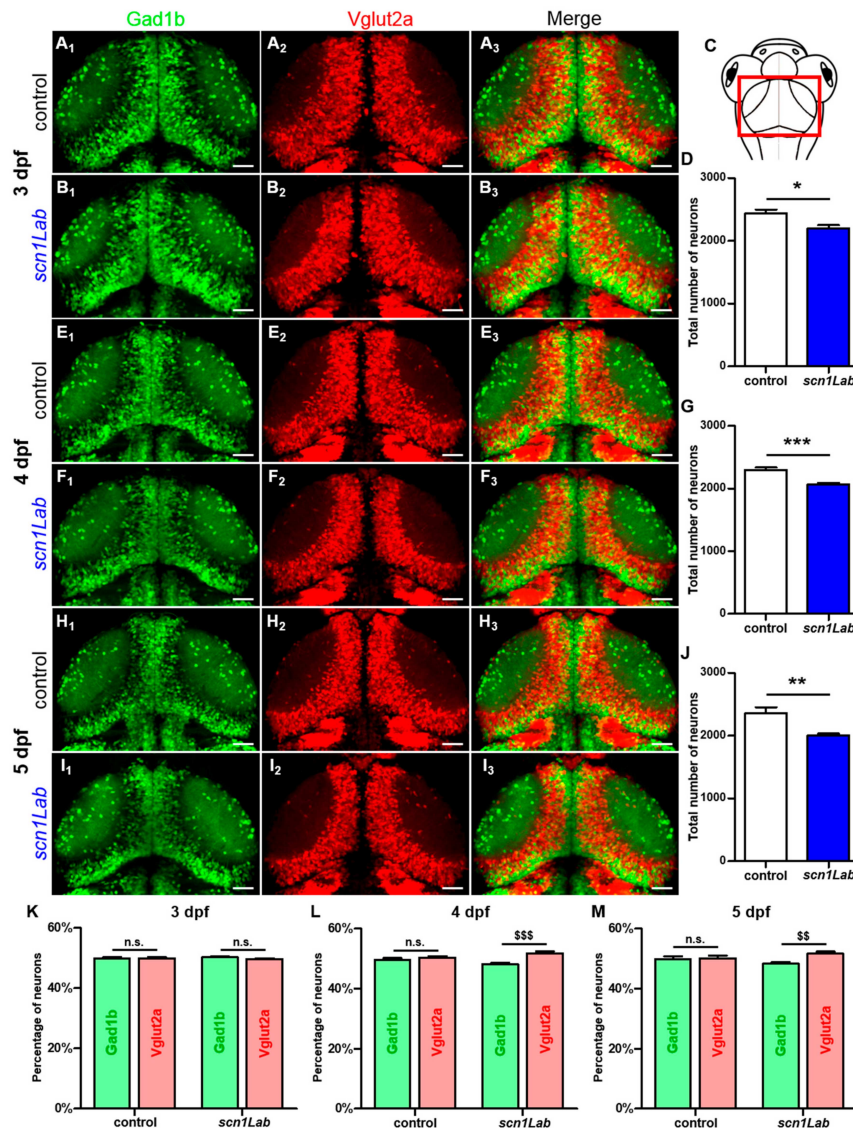


Figure 3. Evolution of the excitatory-inhibitory neuronal population in the *scn1Lab* model. (A₁₋₃, B₁₋₃) Dorsal view of 3 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (A₁₋₃) (*N* = 8) and *scn1Lab* (B₁₋₃) (*N* = 8) living larvae. (A₁, B₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 3 dpf control (A₁) and *scn1Lab* (B₁) larvae. (A₂, B₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 3 dpf control (A₂) and *scn1Lab* (B₂) larvae. (A₃, B₃) Merged image of 3 dpf control (A₃) and *scn1Lab* (B₃) larvae. (C) Dorsal view schematic of a 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest. (E₁₋₃, F₁₋₃) Dorsal view of 4 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (E₁₋₃) (*N* = 8) and *scn1Lab* (F₁₋₃) (*N* = 8) living larvae. (E₁, F₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 4 dpf control (E₁) and *scn1Lab* (F₁) larvae. (E₂, F₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 4 dpf control (E₂) and *scn1Lab* (F₂) larvae. (E₃, F₃) Merged image of 4 dpf control (E₃) and *scn1Lab* (F₃) larvae. (H₁₋₃, I₁₋₃) Dorsal view of 5 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (H₁₋₃) (*N* = 8) and *scn1Lab* (I₁₋₃) (*N* = 8) living larvae. (H₁, I₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 5 dpf control (H₁) and *scn1Lab* (I₁) larvae. (H₂, I₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 5 dpf control (H₂) and *scn1Lab* (I₂) larvae. (H₃, I₃) Merged image of 5 dpf control (H₃) and *scn1Lab* (I₃) larvae. (D, G, J) Number of neurons in control and *scn1Lab* larvae at 3 dpf (D), 4 dpf (G) and 5 dpf (J). (K, L, M) Number of inhibitory and excitatory neurons in control and *scn1Lab* larvae at 3 dpf (K), 4 dpf (L) and 5 dpf (M). All images are representative 20 μm stacks acquired using LSM 880 Zeiss laser scanning confocal microscope equipped with a WPApo 20x/1.0 objective. Scale bar 40 μm. *N* = number of embryos. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001 indicate a statistically significant difference between control and *scn1Lab* larvae. Statistically significant difference between inhibitory and excitatory neuronal population is indicated as \$\$, *p* < 0.01; \$\$\$, *p* < 0.001. *p*-values were determined using Student's unpaired *t*-test.

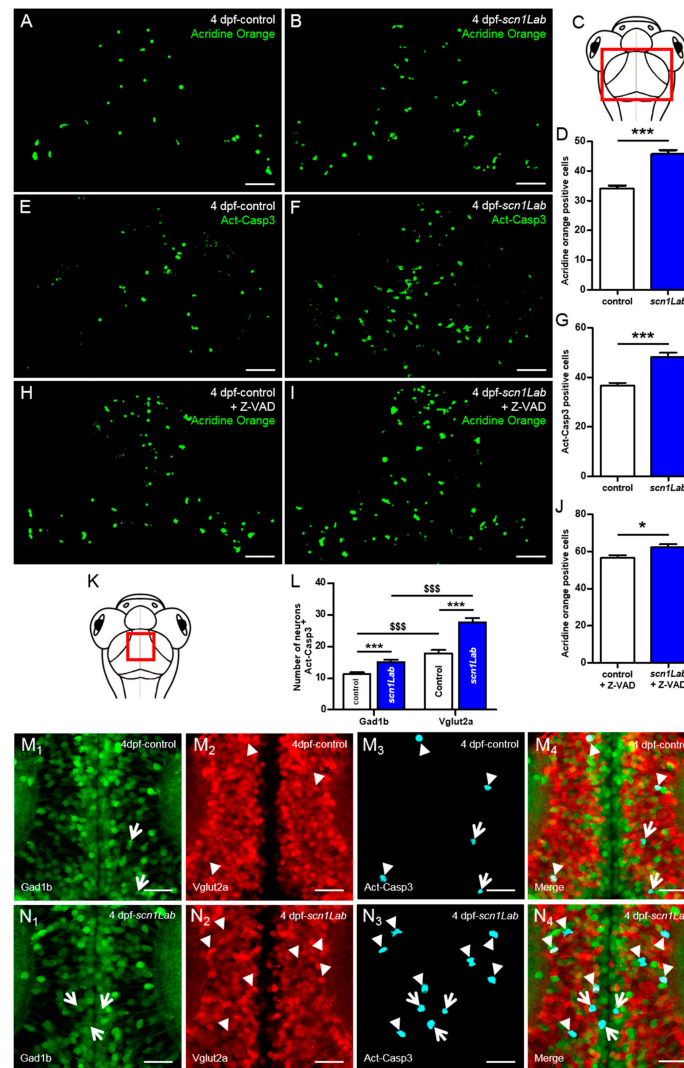


Figure 4. Increased neuronal death in *Scn1Lab*-depleted larvae. (A,B) Dorsal view of 4 dpf living control (A) ($N = 15$) and *scn1Lab* (B) ($N = 15$) larvae stained with acridine orange; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (C) Dorsal view schematic of 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest for global cell death quantification. (D) Number of acridine orange-positive cells in 4 dpf brain. (E,F) Dorsal view of 4 dpf control (E) ($N = 24$) and *scn1Lab* (F) ($N = 22$) brain stained with activated caspase-3 antibody; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (G) Number of activated caspase-3-positive cells in 4 dpf brain. (H-I) Dorsal view of 4 dpf Z-VAD-treated control (H) ($N = 18$) and *scn1Lab* (I) ($N = 16$) larvae stained with acridine orange; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (J) Number of acridine orange-positive cells in 4 dpf brain. (K) Dorsal view schematic of 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest for activated caspase-3 signal colocalization with inhibitory and excitatory neurons quantification. (L) Number of inhibitory (Gad1b:GFP) and excitatory (Vglut2a:DsRed) neurons also showing activated caspase-3 labelling in control and *scn1Lab* larvae. (M₁₋₄, N₁₋₄) Dorsal view of 4 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (M₁₋₄) ($N = 14$) and *scn1Lab* (N₁₋₄) ($N = 14$) brain stained with activated caspase-3 antibody; representative 15 μm stack. Scale bar 10 μm . (M₁,N₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in control (M₁) and *scn1Lab* (N₁) larvae. (M₂,N₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in control (M₂) and *scn1Lab* (N₂) larvae. (M₃,N₃) Activated caspase-3 staining in control (M₃) and *scn1Lab* (N₃) larvae. (M₄,N₄) Merged images of control (M₄) and *scn1Lab* (N₄) larvae. Excitatory neurons with activated caspase-3 expression are shown by arrowheads, while inhibitory neurons with activated caspase-3 expression are shown by arrows. Images were all acquired with an SP8 Leica laser scanning confocal microscope equipped with 40x/water 1.1 objective. N = number of embryos. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ indicate a statistically significant difference between control and *scn1Lab* larvae. A statistically significant difference between inhibitory and excitatory neuronal population is indicated as \$\$\$, $p < 0.001$. p -values were determined using Student's unpaired t -test.

Because *Scn1Lab*-depleted larvae showed an increased number of apoptotic cells, we next investigated whether this apoptosis was caspase-dependent. To test this hypothesis, we used Z-VAD, a cell-permeable caspase inhibitor that reversibly binds to the catalytic site of caspase proteases and inhibits their activity [29]. We incubated 3 dpf *Scn1Lab*-depleted and control embryos for 24 h in E3 medium containing 300 μ M Z-VAD and 1% DMSO [30–32]. As negative control, age-matched *Scn1Lab*-depleted and control larvae were incubated for 24 h in E3 medium containing 1% DMSO. Cell death was assessed using acridine orange staining combined with real-time confocal imaging. Our data show that following Z-VAD treatment, the number of acridine orange-positive cells increased in both control (Figure 4A,H) and *Scn1Lab*-depleted larvae (Figure 4B,I), suggesting that Z-VAD had no effect on cell apoptosis in *scn1Lab* model.

We next examined whether apoptotic death occurred in excitatory or inhibitory neurons. To do this, 4 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed], *Scn1Lab*-depleted and Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control larvae were fixed and analyzed by immunohistochemistry using anti-activated caspase-3 antibody. In both *Scn1Lab*-depleted (Figure 4N₁₋₄) and control (Figure 4M₁₋₄) Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] larvae, we observed a greater number of excitatory neurons expressing activated caspase-3 than inhibitory ones. Quantification of the number of inhibitory and excitatory neurons colocalizing with activated caspase-3 expression, confirmed that neuronal death specifically affects excitatory neurons (Figure 4L; Gad1b⁺-Act-Casp3⁺ vs Vglut2a⁺-Act-Casp3⁺ controls: $p < 0.001$; Gad1b⁺-Act-Casp3⁺ vs Vglut2a⁺-Act-Casp3⁺ *scn1Lab*: $p < 0.001$).

4. Discussion

Dravet syndrome (DS) is a catastrophic childhood epilepsy with multiple comorbidities, which include severe intellectual disability, impaired social development, persistent drug-resistant seizures and high risk of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) [1,33]. In recent years, thanks to vertebrate genome conservation, full genome sequencing and readily available molecular tools and techniques, zebrafish has become a powerful and versatile animal model for studying genetic forms of epilepsy and also to screen for novel anti-epileptic drugs [8,10,22]. Among epilepsy mutants, zebrafish larvae with loss of function of the *scn1Lab* gene, one of the two zebrafish orthologs of *SCN1A*, was instrumental to identify drugs alleviating seizures in refractory epilepsy [8,10]. However, despite the large number of studies that have used *Scn1Lab*-depleted zebrafish mutants and morphants, the neuronal phenotypes induced by loss of function of this sodium channel encoding gene have not yet been fully investigated.

Using combined in vivo calcium imaging and local field potential (LFP) in the optic tectum of zebrafish models of DS, we observed a full correlation between calcium activity and neuronal activity, with both techniques consistently showing generalized ictal-like seizure events. Recent studies showed a correlation between calcium and local field potential activities using an acute PTZ seizure model in zebrafish [14]. To our knowledge, this is the first time that a correlation between calcium and electrical activities has been reported in a genetic model of epilepsy. This finding is important for research on epilepsy because it validates the use of calcium activity to monitor the dynamics of seizures at the scale of an entire vertebrate brain. In particular, calcium imaging provides a unique opportunity to follow the dynamics of seizures spatiotemporally, from the initiation site to propagation through the brain.

We focused on excitatory and inhibitory synapses by studying two important proteins that are markers of synaptic integrity, PSD-95 and gephyrin [23]. PSD-95, by its PDZ domains, serves as a scaffolding protein with a docking site for signaling proteins clustering around NMDA- and AMPA-type glutamate receptors, which are crucial for excitatory neurotransmission and synaptic plasticity [34]. Gephyrin is a core scaffolding protein, the postsynaptic component of inhibitory synapses, and it controls the formation and plasticity of inhibitory synapses through regulation of GABAA and glycine receptors [35]. In the present study, we demonstrated that levels of PSD-95 and gephyrin are modified in zebrafish models of DS. Indeed, by studying the distribution of excitatory and inhibitory neurons during development, we have shown that at 3 days of development, the ratio of excitatory to inhibitory

neurons was comparable between *Scn1Lab*-depleted larvae and their sibling controls. Interestingly, from 4 days of development onward, we observed that the proportion of excitatory neurons increased when compared to that of inhibitory neurons in *scn1Lab*^{AUG} morphants, while this ratio remained unchanged in control embryos. This specific neuronal death may therefore explain the severe gephyrin signal loss observed in the *scn1Lab* model. Moreover, the increase in excitatory neurons detected from 4 dpf onward probably corresponds to the beginning of the disease in *Scn1Lab*-depleted larvae. Interestingly, these data are in good agreement with our results obtained using LFP recording and calcium imaging, showing that the peak of seizures was observable at 4 and 5 dpf in *Scn1Lab*-depleted larvae [8].

Previous studies have shown that subtle changes in synaptic structure or composition, which alter synaptic plasticity and functional responses, most likely contribute to synaptic dysfunction [36]. Differences in key synaptic protein levels can provide information about the excitatory/inhibitory components of neurotransmission that might be disturbed or impaired during epileptogenesis [37]. It is known that the balance between excitatory and inhibitory synapses is impaired in patients with epilepsy [20]. These results are also in line with the observation of Stief et al. (2007) in another model of epilepsy in rats, that the balance between excitatory and inhibitory synapses is shifted toward an over-excited state [19].

Our results using a zebrafish model of DS show an increase in apoptotic cells as previously observed in models of epilepsy [26–28]. We have also shown that treatment of *Scn1Lab*-depleted larvae with Z-VAD fails to inhibit cell death, suggesting that Z-VAD has no effects on cell apoptosis in *scn1Lab* model. However, we cannot exclude the possibility that Z-VAD may cause cellular toxicity in *scn1lab* model thus masking its protective effect. Unexpectedly, colocalization analysis of inhibitory and excitatory neurons with activated caspase-3 staining at 4 dpf revealed that cell death preferentially targeted excitatory neurons. This could be explained by the fact that during seizures, excitatory neurons are hyper-excited and eventually die. In relation to this hypothesis, we sometimes observed during in vivo calcium imaging, using larvae from transgenic line Tg[*HuC:GCaMP5G; scn1Lab*], that some neurons became hyper-excited, as revealed by the over-expression of GFP labeling, and die (personal observations).

Our study emphasizes that the DS models are not only a powerful new tool for finding new antiepileptic drug candidates that could alleviate refractory seizures [8–10], but more importantly, they also display neurodevelopmental alterations characteristic of epileptic brains, such as the imbalance of excitatory/inhibitory synapses and apoptosis. Our data thus provide in vivo evidence for a developmental aspect of epileptogenesis that had been hypothesized [38,39], but not definitely proved. Our study shows that DS is a disease of the central nervous system, and it calls for a closer focus on neurodevelopmental defects leading to severe comorbidities in DS (speech deficiency, autism, etc.) and not just on managing refractory seizures with antiepileptic drugs. More research is needed to understand the exact neurodevelopmental abnormalities causing epilepsy and to correct them as early as possible, rather than only treating them symptomatically at later stages. In the same way, we showed previously that *gabra1* loss of function (generalized epilepsy) induced developmental alterations, in particular for the establishment of GABAergic networks throughout the brain [22].

The findings reported here shed light on the neurobiological changes that occur in the early stages of DS, and are a promising start in understanding the neurodevelopmental origins of DS and finding potential treatments to restore normal brain development at earlier stages of the disease.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1199/s1>, Figure S1: Comparison of *scn1Lab*^{AUG} morphant and *scn1Labs552/s552* mutant morphology and locomotor activity, and <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1199/s2>, Figure S2: Neuronal activity of *scn1Lab* model.

Author Contributions: N.S.-Y. and A.B., conceived and planned the experiments. A.B., performed the analysis, and designed the figures. R.H.-A., and J.S., contributed to the analysis of the results. C.Y., was involved in the planning and the reviewing of the manuscript. N.S.-Y., supervised the findings of this work, wrote and refined the article.

Funding: This work was supported by Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), the French National Research Agency (ANR-16-CE18-0010), and Fondation NRJ (Institut de France) to NSY. Funding sources had no involvement in study design, collection, analysis or interpretation of data, or decision to publish.

Acknowledgments: We also thank Christiane Romain (Inserm UMR 1141), Olivier Bar (Inserm UMR 1141), and Solène Renault (Inserm UMR 1141) for their technical assistance.

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

References

1. Dravet, C. Dravet syndrome history. *Dev. Med. Child Neurol.* **2011**, *53*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nolan, K.J.; Camfield, C.S.; Camfield, P.R. Coping with Dravet syndrome: Parental experiences with a catastrophic epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **2006**, *48*, 761–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ohno, Y. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *41*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Obata, K. Synaptic inhibition and γ -aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2013**, *89*, 139–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ablain, J.; Zon, L.I. Of fish and men: Using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 584–586. [[CrossRef](#)]
6. Grone, B.P.; Baraban, S.C. Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 339–343. [[CrossRef](#)]
7. Sourbron, J.; Partoens, M.; Scheldeman, C.; Zhang, Y.; Lagae, L.; Witte, P. Drug repurposing for Dravet syndrome in *scn1Lab^{-/-}* mutant zebrafish. *Epilepsia* **2019**, *60*, e8–e13. [[CrossRef](#)]
8. Baraban, S.C.; Dinday, M.T.; Hortopan, G.A. Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2410. [[CrossRef](#)]
9. Dinday, M.T.; Baraban, S.C. Large-Scale Phenotype-Based Antiepileptic Drug Screening in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* **2015**, *2*. [[CrossRef](#)]
10. Zhang, Y. Pharmacological Characterization of an Antisense Knockdown Zebrafish Model of Dravet Syndrome: Inhibition of Epileptic Seizures by the Serotonin Agonist Fenfluramine. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125898. [[CrossRef](#)]
11. Grone, B.P.; Qu, T.; Baraban, S.C. Behavioral Comorbidities and Drug Treatments in a Zebrafish *scn1lab* Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Griffin, A.; Hamling, K.R.; Knupp, K.; Hong, S.; Lee, L.P.; Baraban, S.C. Clemizole and modulators of serotonin signalling suppress seizures in Dravet syndrome. *Brain* **2017**, *140*, 669–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kumar, M.G.; Rowley, S.; Fulton, R.; Dinday, M.T.; Baraban, S.C.; Patel, M. Altered Glycolysis and Mitochondrial Respiration in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* **2016**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)]
14. Liu, J.; Baraban, S.C. Network Properties Revealed during Multi-Scale Calcium Imaging of Seizure Activity in Zebrafish. *eNeuro* **2019**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sourbron, J. Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 588–598. [[CrossRef](#)]
16. Akerboom, J. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 13819–13840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Turrigiano, G.G.; Nelson, S.B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 97–107. [[CrossRef](#)]
18. Kantamneni, S. Cross-talk and regulation between glutamate and GABAB receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 135. [[CrossRef](#)]
19. Stief, F.; Zuschratter, W.; Hartmann, K.; Schmitz, D.; Draguhn, A. Enhanced synaptic excitation-inhibition ratio in hippocampal interneurons of rats with temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 519–528. [[CrossRef](#)]
20. Eichler, S.A. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2848–2866. [[CrossRef](#)]
21. Swaminathan, A. Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1924–1937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Samarut, É. γ -Aminobutyric acid receptor alpha 1 subunit loss of function causes genetic generalized epilepsy by impairing inhibitory network neurodevelopment. *Epilepsia* **2018**, *59*, 2061–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yan, Q.; Zhai, L.; Zhang, B.; Dallman, J.E. Spatial patterning of excitatory and inhibitory neuropil territories during spinal circuit development. *J. Comp. Neurol.* **2017**, *525*, 1649–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Satou, C.; Kimura, Y.; Higashijima, S.I. Generation of Multiple Classes of V0 Neurons in Zebrafish Spinal Cord: Progenitor Heterogeneity and Temporal Control of Neuronal Diversity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 1771–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Satou, C.; Kimura, Y.; Hirata, H.; Suster, M.L.; Kawakami, K.; Higashijima, S.I. Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* **2013**, *140*, 3927–3931. [[CrossRef](#)]
26. Li, Q. Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: Changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels. *Neurosci. Res.* **2018**, *130*, 47–55. [[CrossRef](#)]
27. Kotloski, R.; Lynch, M.; Lauersdorf, S.; Sutula, T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog. Brain Res.* **2002**, *2*, 95–110.
28. Henshall, D.; Murphy, B. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 75–81. [[CrossRef](#)]
29. Callus, B.A.; Vaux, D.L. Caspase inhibitors: Viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 73–78. [[CrossRef](#)]
30. Dong, W. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 191–201. [[CrossRef](#)]
31. Gregory-Evans, C.Y.; Moosajee, M.; Shan, X.; Gregory-Evans, K. Gene-specific differential response to anti-apoptotic therapies in zebrafish models of ocular Coloboma. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 1473–1484. [[PubMed](#)]
32. Williams, J.A.; Holder, N. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear. Res.* **2000**, *143*, 171–181. [[CrossRef](#)]
33. Le Gal, F. A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with SCN1A mutation. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1915–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sheng, M. Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7058–7061. [[CrossRef](#)]
35. Pizzarelli, R. Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. He, H.; Shen, W.; Zheng, L.; Guo, X.; Cline, H.T. Excitatory synaptic dysfunction cell-autonomously decreases inhibitory inputs and disrupts structural and functional plasticity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2893. [[CrossRef](#)]
37. Bonansco, C.; Fuenzalida, M. Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, 1–13. [[CrossRef](#)]
38. Tanaka, M.; DeLorey, T.M.; Delgado-Escueta, A.; Olsen, R.W. GABRB3, Epilepsy, and Neurodevelopment. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]*, 4th ed.; Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Eds.; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA, 2012.
39. Bozzi, Y.; Casarosa, S.; Caleo, M. Epilepsy as a Neurodevelopmental Disorder. *Front. Psychiatry* **2012**, *3*, 19. [[CrossRef](#)]



Deuxième article. “Étude de l’impact des crises d’épilepsie sur les cellules microgliales et leur rôle neuro-protecteur”

Alexandre Brenet, et al. & Nadia Soussi-Yanicostas

(En préparation)

Résumé de l’article

Les crises d’épilepsie résultent d’une augmentation incontrôlée de l’excitabilité neuronale dans le cerveau. Celles-ci induisent alors un stress des cellules du système nerveux central et, notamment, des microglies. En effet, suite à ce stress, ces cellules s’activent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui pourraient fragiliser les neurones et ainsi aggraver les crises. Le but de mon travail fut, tout d’abord, de caractériser le comportement des cellules microgliales dans le contexte du modèle *scn1Lab* d’épilepsie chez le poisson zèbre. J’ai ainsi pu montrer que la perte de fonction du gène *scn1Lab* provoque une modification de la répartition des sous-populations de microglies avec une augmentation du pourcentage de microglie « amiboïdes » et une diminution des microglies « ramifiées ». Ces modifications sont aussi corrélées avec une augmentation du nombre de microglies exprimant la protéine Il-1 β , signe de l’activation pro-inflammatoire de ces dernières. De plus, j’ai pu constater une modification de la dynamique de ces cellules, lesquelles passent de motiles (des microglies avec des ramifications très motiles mais des corps cellulaires immobiles) à mobiles (des microglies dont les corps cellulaires sont très mobiles). Suite à ces observations, nous avons voulu connaître l’implication des microglies dans les crises épileptiformes. Nous avons alors produit des embryons dépourvus de microglie et nous avons montré que l’absence de microglie entraîne une augmentation de l’excitabilité neuronale. Ce travail décrit la réponse des cellules microgliales au stress provoqué par les crises épileptiformes dans le modèle *scn1Lab* et montre les défauts additionnels qui sont induits par l’absence des cellules microgliales.

Introduction

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (Lenz and Nelson 2018). Il existe de nombreuses hypothèses quant à leur implication dans les épilepsies. La plus répandue est centrée sur la réponse inflammatoire des microglies face à l’augmentation de l’excitabilité neuronale (Vezzani et al. 2013). En effet, les crises d’épilepsie enclencheraient un stress important pour les cellules microgliales qui, en réponse,

sécréteraient alors des cytokines pro-inflammatoires (Vezzani et al. 2008). Plusieurs résultats suggèrent que cet afflux de cytokines fragiliserait les neurones et augmenterait leur excitabilité, créant ainsi un cercle vicieux entretenant les crises d'épilepsie. Nous avons tiré avantage de notre modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre pour étudier, dans un organisme vivant et en temps réel, le comportement des cellules microgliales.

Résultats

Caractérisation de la morphologie des cellules microgliales dans le modèle Dravet

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressé à la morphologie des cellules microgliales au sein du cerveau des larves *scn1Lab* grâce à la lignée transgénique Tg[mpeg1:mcherryF], exprimant le fluorophore mCherry dans tous les macrophages des embryons, ce qui comprend la microglie. Nous avons observé un changement de la morphologie de ces cellules dans les larves âgées de 4 jours post-fertilisation (jpf) (**Article 2, Figure 1A₁, 1B₁**). Comme nous pouvons le voir sur les reconstructions 3D des cellules microgliales individuelles, dans un contexte *scn1Lab*-KD, ces cellules présentent un corps cellulaire plus volumineux, des prolongements moins longs et moins nombreux (**Article 2, Figure 1B₂₋₃**), que chez les embryons contrôles (**Article 2, Figure 1A₂₋₃**). Afin de mieux caractériser ces changements morphologiques, nous avons ensuite quantifié plusieurs paramètres morphologiques grâce au logiciel d'analyse 3D Imaris. Nous avons ainsi montré que les microglies au sein du cerveau des embryons *scn1Lab*-KD possèdent une sphéricité plus importante (contrôle: $0,567 \pm 0,006$ vs *scn1Lab*-KD : $0,644 \pm 0,006$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 1C**), une réduction du nombre de prolongements (contrôle : $6,3 \pm 0,2$ vs *scn1Lab*-KD : $5,1 \pm 0,2$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 1D**), une réduction de la longueur totale (contrôle : $115 \pm 3 \mu\text{m}$ vs *scn1Lab*-KD : $85 \pm 3 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 1E**) et moyenne de ces prolongements (contrôle : $23,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ vs *scn1Lab*-KD : $19,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 1F**), ainsi qu'une diminution de l'indice de ramification (contrôle : $1,94 \pm 0,05$ vs *scn1Lab*-KD : $1,74 \pm 0,05$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 1G**). Nous avons aussi réalisé une étude de Sholl afin d'étudier la ramification et l'étalement des prolongements microgliaux. Cette étude indique alors que les cellules microgliales issues des embryons *scn1Lab*-KD possèdent une densité de prolongements moins importante et que ceux-ci sont moins étendus que dans les contrôles (**Article 2, Figure 1J**). Ces différences morphologiques étant assez subtiles et les cellules présentant une certaine diversité de phénotypes, nous avons décidé d'effectuer une

analyse en cluster afin de rassembler les différentes cellules microgliales en fonction de leur morphologie individuelle (sphéricité, nombre de prolongements, longueur des prolongements, surface et volume). Cette analyse a permis d'identifier trois grandes populations de microglies, présentes dans les deux contextes : contrôle et *scn1lab*-KD. La première comprend les cellules « ramifiées », caractérisées par sphéricité faible, des prolongements nombreux et longs, une aire et un volume importants. La deuxième correspond à des cellules dites « amiboïdes » avec des caractéristiques inverses aux cellules « ramifiées ». La troisième est composée des cellules, qui ont des caractéristiques intermédiaires, et que nous avons appelé microglies « transitionnelles » (**Article 2, Figure 1H**). D'une manière intéressante, ces trois populations sont présentes dans les deux contextes, mais leur proportions sont très différentes. Dans le contexte *scn1Lab*-KD, on note une augmentation importante du pourcentage de microglie « amiboïdes » (contrôle : $10,4 \pm 0,3\%$ vs *scn1Lab*-KD : $29,1 \pm 1,2\%$; $p < 0,001$) contre balancé par une diminution importante du pourcentage de microglie ramifiées (contrôle : $27,8 \pm 1,5\%$ vs *scn1Lab*-KD : $10,2 \pm 0,8\%$; $p < 0,01$) (**Article 2, Figure 1I**). Ces changements de morphologie indiquent un changement de l'état d'activation de la microglie dans le cadre du modèle de Dravet.

Étude de la dynamique microgliale dans le modèle Dravet

Après avoir caractérisé les changements morphologiques de la microglie dans les embryons *scn1Lab*-KD, nous nous sommes intéressés à la dynamique (mobilité des corps cellulaires) de ces cellules dans ce contexte d'activité neuronale accrue. Nous avons donc filmé les microglies des embryons contrôles et *scn1Lab*-KD, âgés de 4 jpf, pendant une heure. Ce suivi en temps réel de la dynamique des cellules microgliales montre à quel point ces cellules sont plastiques comme le montre les changements morphologiques importants qui ont lieu pendant l'heure d'enregistrement. Nous avons aussi observé que le corps cellulaire des microglies des embryons contrôles ne se déplace pas mais que leurs prolongements sont très actifs et établissent d'une manière continue des contacts transitoires avec les cellules neuronales environnantes (**Article 2, Figure 2A, 2C₁, 2F₁**). A l'opposé, le corps cellulaire des microglies des embryons *scn1Lab*-KD est beaucoup plus mobile (**Article 2, Figure 2B, 2C₂, 2F₂**). Grâce au logiciel d'analyse 3D Imaris, nous avons pu quantifier la distance parcourue par le corps cellulaire des microglies et nous avons montré que ces dernières parcourent une distance significativement plus importante dans les embryons *scn1Lab*-KD comparée à la

distances calculées chez les contrôles (contrôle : $78,9 \pm 3,8 \mu\text{m}$ vs *scn1Lab*-KD : $112,0 \pm 4,7 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 2D**). De même, ces microglies se déplacent à une vitesse plus importante dans le contexte *scn1Lab*-KD (contrôle : $0,0229 \pm 0,0011 \mu\text{m/s}$ vs *scn1Lab*-KD : $0,0317 \pm 0,0014 \mu\text{m/s}$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 2E**). Ainsi nos résultats montrent une modification importante du comportement des cellules microgliales, lesquelles deviennent beaucoup plus mobiles.

Étude du profil inflammatoire des embryons *scn1Lab*-KD

Dans la continuité des résultats précédents, nous avons cherché à déterminer le profil inflammatoire dans le cerveau des embryons *scn1Lab*-KD afin de savoir si les modifications de la répartition des différentes sous-populations microgliales en faveur des microglies de type amiboïde, coïncidaient avec une augmentation de la neuroinflammation. Pour cela, nous avons quantifié l'expression des transcrits codant les cytokines pro-inflammatoires (*il-1 β* et *il-8*) et anti-inflammatoires (*il-10*, *il-4* et *tgf β 3*) dans le cerveau entier des larves de 4 jpf. Cependant, nous n'avons observé aucune modification de l'expression des gènes ces cytokines, même pro-inflammatoires : *il-1 β* (contrôle : $1,00 \pm 0,22$ vs *scn1Lab*-KD : $1,33 \pm 0,18$; $p > 0,05$) et d'*il-8* (contrôle : $1,00 \pm 0,09$ vs *scn1Lab*-KD : $0,93 \pm 0,11$; $p > 0,05$) (**Article 2, Figure 3A, 3B**). Ces résultats peuvent s'expliquer par la potentielle dilution de l'expression de ces gènes face l'expression de l'ensemble des gènes neuronaux. C'est pourquoi nous avons décidé de focaliser cette étude sur les cellules microgliales uniquement. Pour se faire, nous avons croisé les lignées Tg[mpeg1:mcherryF] et Tg[il-1 β :GFP] afin d'observer l'expression de l'Il-1 β spécifiquement au sein des microglies. Nous avons ensuite produit des embryons *scn1Lab*-KD qui ont été photographiés à 4 jpf (**Article 2, Figure 3C, 3D**) puis nous avons quantifié le nombre de cellules microgliales co-exprimant la mCherry et la GFP. Les résultats montrent alors une augmentation très significative du pourcentage de cellules microgliales exprimant de l'Il-1 β (contrôle : $14,6 \pm 1,7$ vs *scn1Lab*-KD : $33,6 \pm 1,7$; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 3F**). Ces résultats confirment une augmentation du nombre de cellules microgliales activées dans le contexte Dravet, qui est en accord avec l'augmentation du nombre de microglie de type « amiboïdes » caractérisée précédemment. Ces résultats suggèrent fortement que les microglies adoptent un phénotype pro-inflammatoire en réponse à l'hyperexcitation neuronale.

Études des conséquences de l'ablation génétique des cellules microgliales sur l'activité neuronale des embryons Dravet

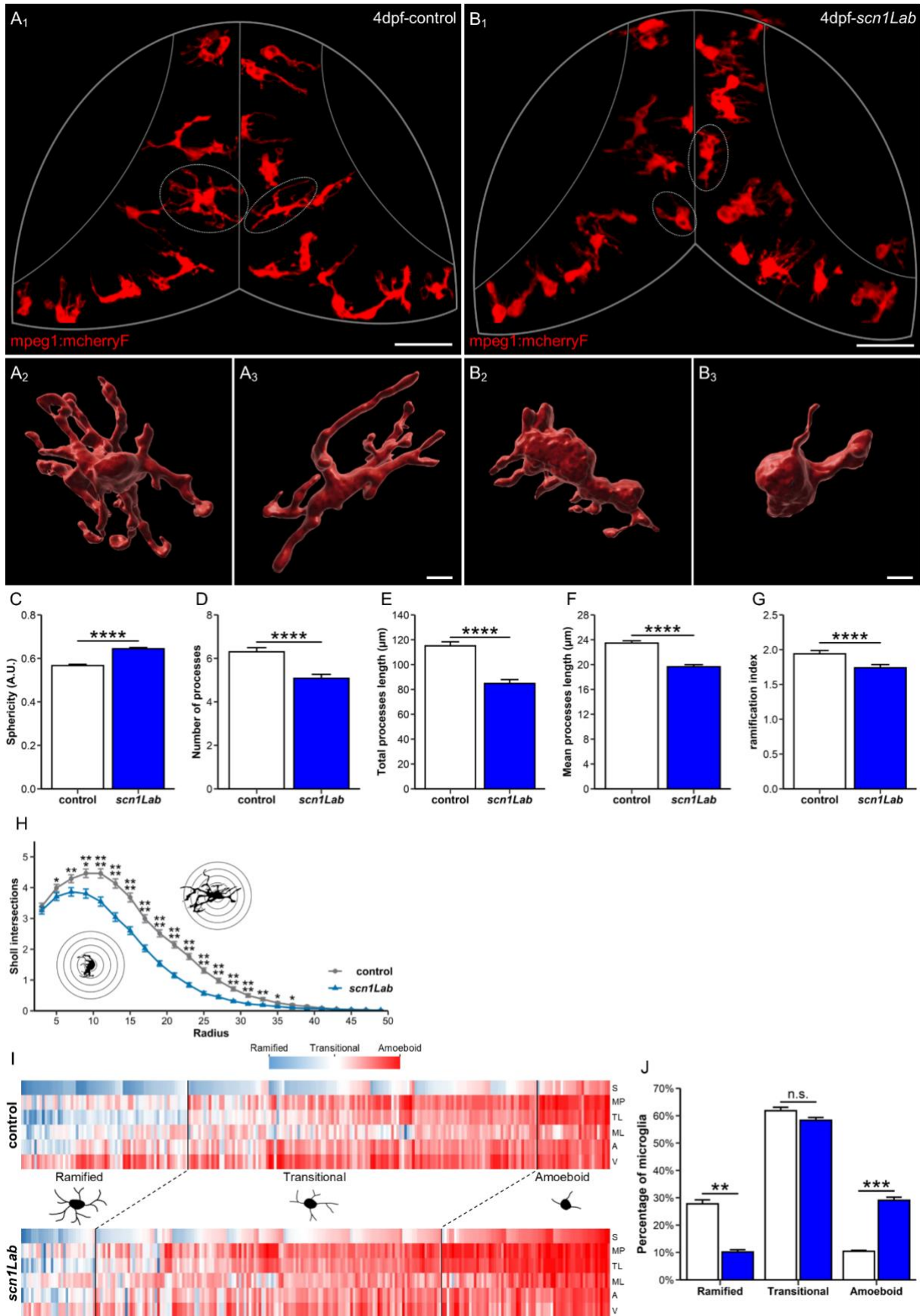
Suite à ces observations sur les changements des cellules microgliales dans le contexte *scn1Lab*-KD, nous avons voulu étudier l'effet de ces changements microgliaux sur les crises d'épilepsie. Pour déterminer le rôle de la microglie dans ce contexte d'activité neuronale accrue, nous avons produit des embryons *scn1Lab*-KD dépourvus de microglies, en co-injectant le morpholino *scn1Lab*^{AUG} avec le morpholino *pU1*^{AUG}, un modèle génétique établi pour produire des embryons totalement dépourvus de microglie. Nous avons ensuite évalué l'activité neuronale de ces embryons à l'âge de 4 jpf en utilisant, à la fois l'enregistrement de l'activité électrique par EEG, mais aussi par le suivi des influx des ions calciques dans les neurones par imagerie calcique (**Article 2, Figure 4A**). Comme montré précédemment dans le premier article, les embryons *scn1Lab*-KD montrent une activité neuronale accrue caractérisée, en EEG (contrôle : $4,8 \pm 1,2$ vs *scn1Lab*-KD : $28,2 \pm 2,4$; $p < 0,0001$) et en imagerie calcique (contrôle : $16,5 \pm 1,0$ vs *scn1Lab*-KD : $32,2 \pm 1,4$; $p < 0,0001$), par une augmentation du nombre d'événements de type épileptiforme (**Article 2, Figure 4B, 4C, 4D₁, 4E₁**), sans modifier l'intensité de ces événement (**Article 2, Figure 4D₂, 4E₂**). Après l'ablation des cellules microgliales, nous avons observé une augmentation de l'intensité des crises de type épileptiforme (**Article 2, Figure 4B, 4C, 4D₂, 4E₂**) sans modification de leur fréquence (**Article 2, Figure 4D₁, 4E₁**). Ces résultats montrent qu'une absence de colonisation du cerveau par les microglies conduit à une dérégulation de l'activité neuronale dans ce contexte pathologique.

Études des conséquences de l'ablation génétique des cellules microgliales sur l'activité locomotrice des embryons *scn1Lab*-KD

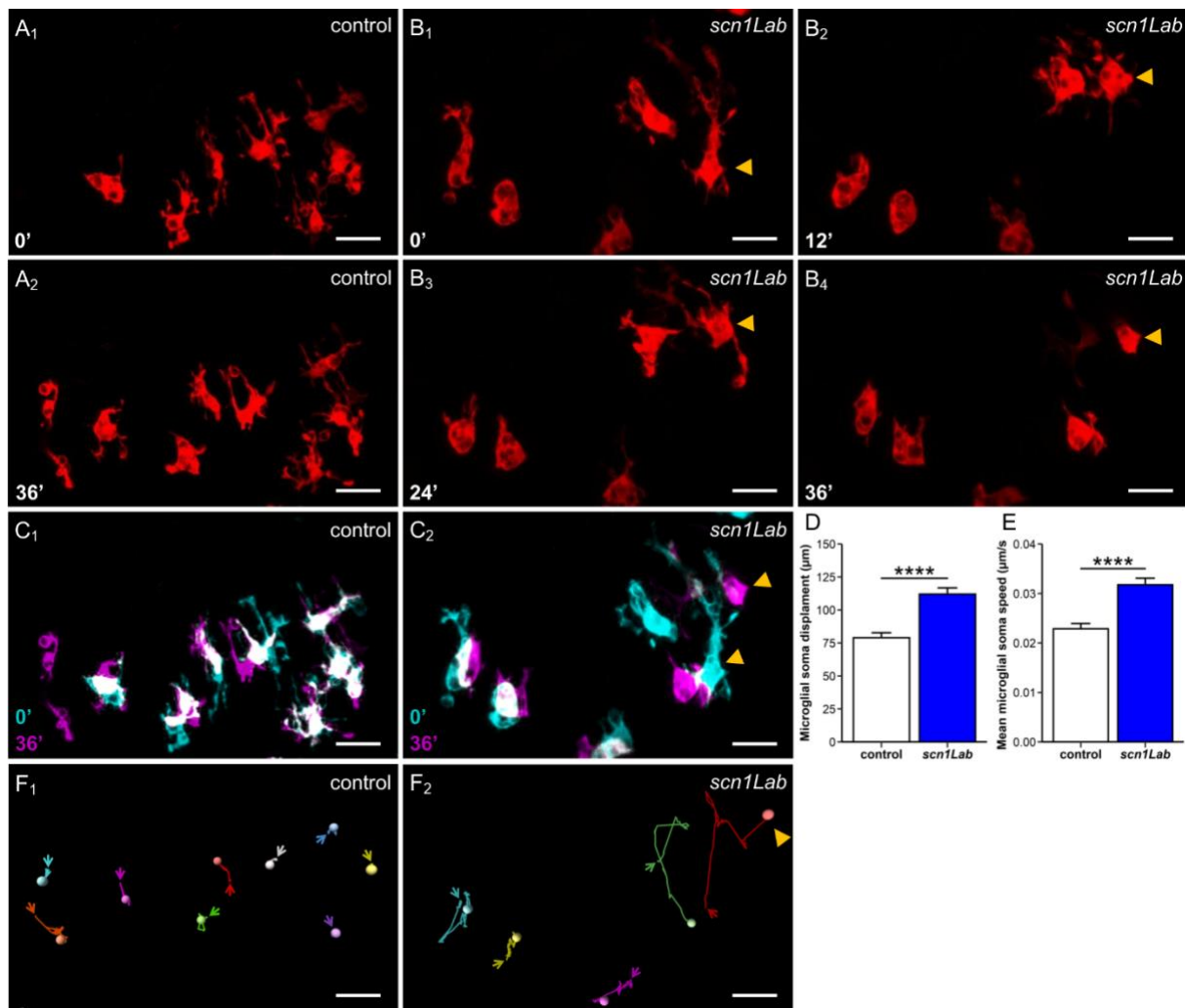
Dans le but de compléter les observations précédentes, nous avons enregistré et analysé l'activité locomotrice des larves, un paramètre en relation directe avec l'activité neuronale (**Article 2, Figure 5A**). Nous avons ainsi montré que la simple perte de fonction du gène *scn1Lab* induit une augmentation significative des mouvements des larves, comme le montre la différence de la distance parcourue par ces individus par rapport aux contrôles (contrôle : 212 ± 11 mm vs *scn1Lab*-KD : 355 ± 11 mm ; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 5B-D**). La déplétion des microglies dans les embryons *scn1Lab*-KD provoque une augmentation encore plus importante de l'agitation des larves et de la distance parcourue (*scn1Lab*-KD : 355 ± 11 mm vs *scn1Lab*-KD sans microglies: 423 ± 12 mm ; $p < 0,0001$) (**Article 2, Figure 5B-D**). Ce résultat

montre que l'action conjointe de la perte de fonction du gène *scn1Lab* qui provoque une augmentation de la fréquence des crises épileptiformes, et l'absence de cellules microgliales qui induit une augmentation de l'intensité des crises épileptiformes, se conjuguent.

Figures

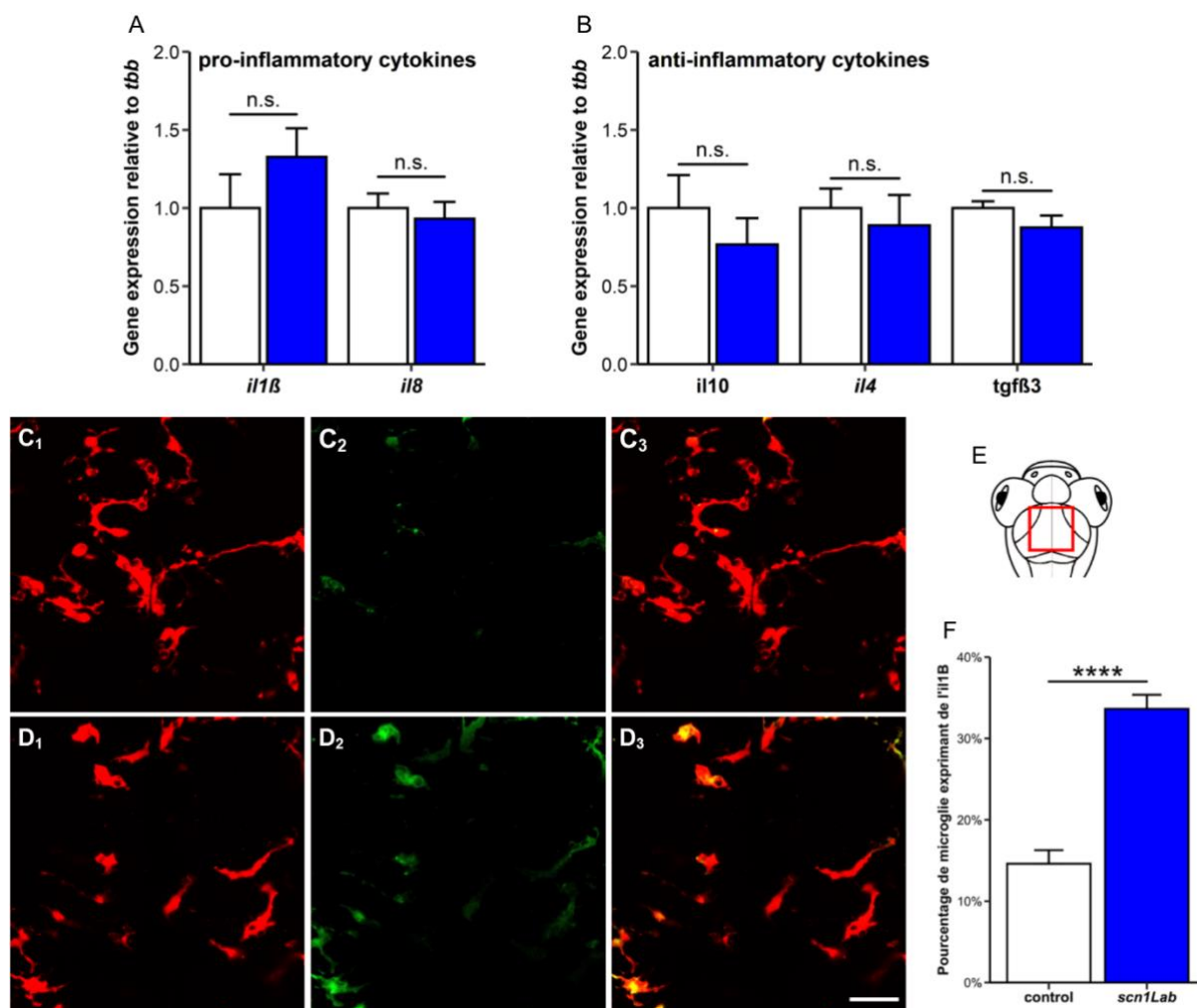


Article 2, Figure 1 : Caractérisation de la morphologie des cellules microgliales dans le modèle Dravet. (A-B) Vue dorsale d'embryons *Tg[mpeg1:mcherryF]* contrôle (A) et *scn1Lab-KD* (B) âgés de 4 jpf, montrant la morphologie des cellules microgliales présentes dans le tectum optique (A₁, B₁) ainsi que des reconstructions 3D des microglies d'un embryon contrôle (A₂₋₃) et d'un embryon *scn1Lab-KD* (A₂₋₃). (C-G) Quantification des paramètres morphologiques de la microglie : la sphéricité (C), le nombre de prolongements (D), la longueur totale des prolongements (E), la longueur moyenne d'un prolongement (F) et l'indice de ramification (G), chez les embryons *scn1Lab-KD* (N = 11 ; n = 239) et les embryons contrôles (N = 11 ; n = 228). (H) Analyse de Sholl des microglies d'embryons contrôles (noir) et *scn1Lab-KD* (bleu). (I) Analyse par cluster des populations microgliales des embryons *scn1Lab-KD* âgés de 4 jpf et celles d'embryons contrôles du même âge. L'analyse, réalisée en tenant compte de six paramètres; la sphéricité (S), le nombre de prolongements (MP), la longueur totale (TL) et moyenne (ML) de ces derniers, et la surface (A) et le volume (V) des microglies, a conduit à l'identification de trois clusters : amiboïdes, ramifiées et transitionnelles. (J) Répartition des microglies des embryons contrôles (blanc) et *scn1Lab-KD* (bleu) dans les trois clusters définis précédemment. Échelles (A₁, B₁) : 50 µm ; (A₂₋₃, B₂₋₃) : 10 µm. N = nombre de larves analysées et n = nombre de microglies analysées. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Tous les graphiques représentent la moyenne ± sem. Les p-values ont été calculées en utilisant un t-test de Student. n.s., non significatif ; **, p < 0,01 ; ***, p < 0,001 ; ****, p < 0,0001.



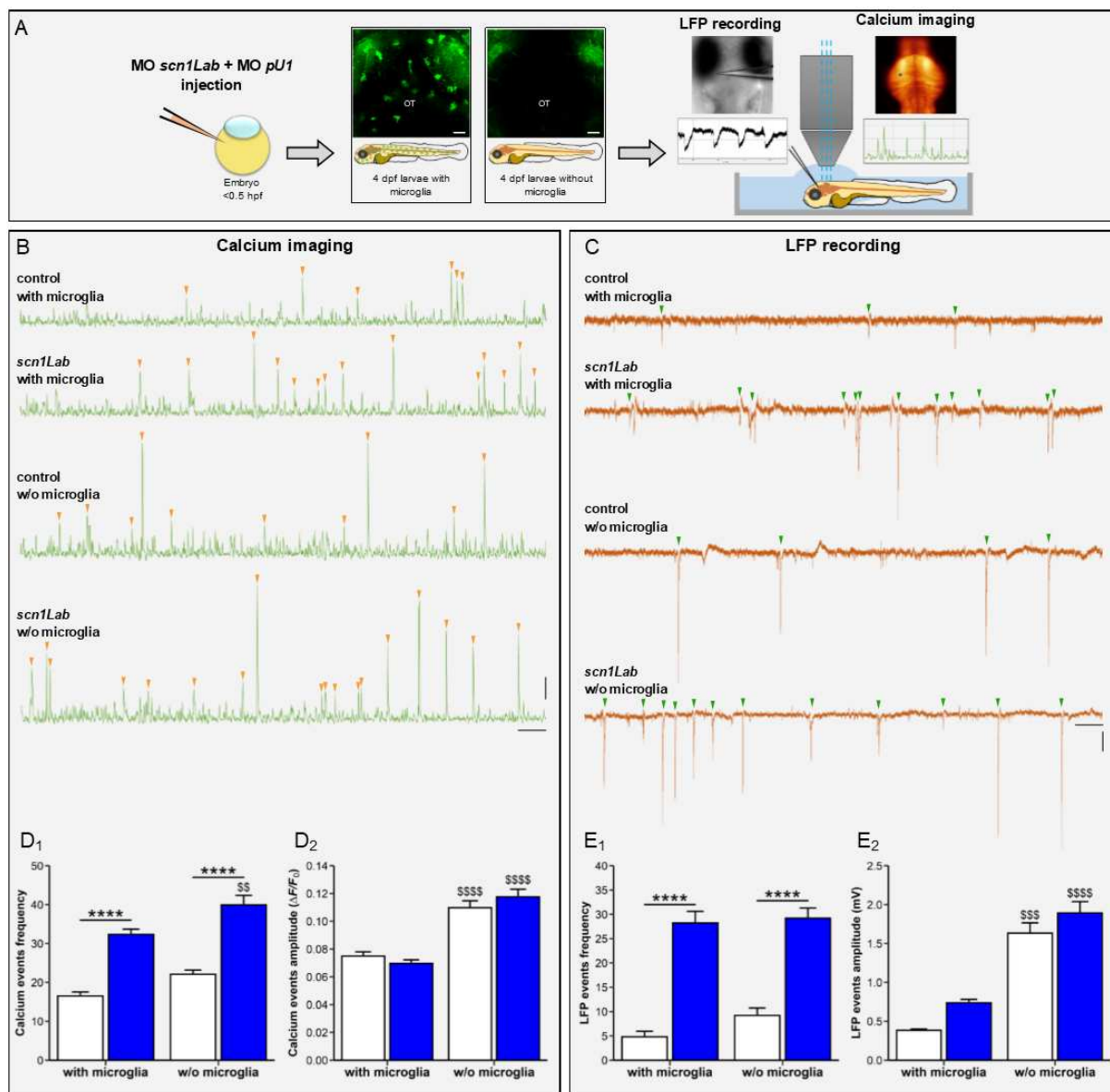
Article 2, Figure 2 : Étude de la dynamique des cellules microgliales dans le modèle *scn1Lab*.

(A-B) Séquences d'images issues du microscope confocal montrant la dynamique des cellules microgliales en temps réel dans le cerveau des embryons contrôles (A) et *scn1Lab*-KD (B) âgés de 4 jpf. (C) Images superposées de deux temps (0' : cyan ; 36' : magenta), soulignant les déplacements des microglies. (D-E) Quantification de la distance parcourue par le corps des cellules microgliales (D) et de leur vitesse (E) pendant les 60 minutes d'enregistrement dans les embryons contrôles (N = 4; n = 46) et *scn1Lab*-KD (N = 6; n = 55) âgés de 4 jpf. (F) Tracés des déplacements des corps des microglies pendant les 60 minutes d'enregistrement. Échelle : 20 µm. N = nombre d'embryons et n = nombre de microglies analysées. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 40x/eau d'une ouverture numérique de 1,1. Tous les graphiques représentent la moyenne ± sem. Les p-values ont été calculées en utilisant le test de Mann-Whitney. ****, p < 0,0001.



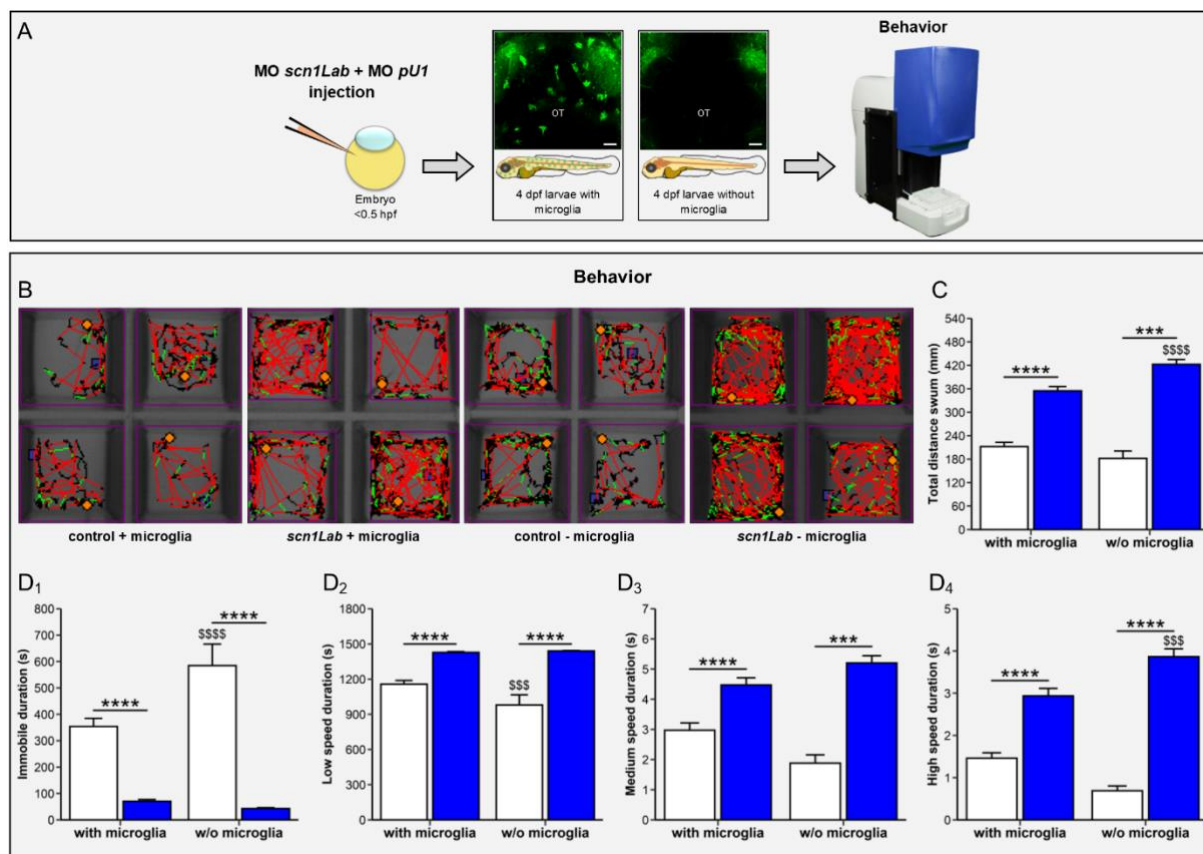
Article 2, Figure 3 : Étude du profil inflammatoire des embryons *scn1Lab*. (A) Quantification de l'expression des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires, *il-1β* et *il-8*, relativement à celle du gène *tbb*, dans le cerveau des larves contrôles et *scn1Lab*-KD, âgées de 4 jpf. (B) Quantification de l'expression des gènes codant les cytokines anti-inflammatoires, *il-10*, *il-4* et *tgfb3*, relativement à celle du gène *tbb*, dans le cerveau des larves contrôles et *scn1Lab*-KD âgées de 4 jpf. (C-D) Vue dorsale du stratum periventriculaire des larves contrôles (C) et *scn1Lab*-KD (D) âgées de 4 jpf, montrant les cellules microgliales (C₁, D₁), l'expression de la protéine *Il-1β* (C₂, D₂), ainsi que la superposition des deux signaux (C₃, D₃). (E) Schéma de la tête d'une larve de poisson zèbre avec la zone d'intérêt (le stratum périvericulaire) encadrée en rouge. (F) Quantification du pourcentage de cellules microgliales exprimant la cytokine *Il-1β* dans les larves contrôles (N = 19) et *scn1Lab*-KD (N = 16). Échelle : 10 μm. N = nombre de larves analysées. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Tous les graphiques représentent la

moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées en utilisant un t-test de Student. n.s., non significatif; ****, $p < 0,0001$.



Article 2, Figure 4 : Conséquences de l'ablation génétique de la microglie sur l'hyperactivité neuronale des embryons Dravet. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Graphiques représentatifs de l'activité calcique des neurones des embryons contrôles (N = 11), *scn1Lab*-KD (N = 16), contrôles sans microglies (N = 9) et *scn1Lab*-KD sans microglies (N = 9) (de haut en bas), âgés de 4 jpf. (C) Enregistrements de l'activité électrique des neurones des embryons contrôles (N = 5), *scn1Lab*-KD (N = 5), contrôles sans microglies (N = 5) et *scn1Lab*-KD sans microglies (N = 5) (de haut en bas), âgés de 4 jpf. (D) Quantification de la fréquence (D₁) et de l'amplitude (D₂) des événements calciques. (E) Quantification de la fréquence (E₁) et de

l'amplitude (E_2) des événements électriques. Échelles (B) : 0,05 $\Delta F/F_0$ et 1 min ; (C) : 0,5 mV et 1 min. N = nombre de larves. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. ****, $p < 0,0001$: indique une différence statistique entre les génotypes. \$\$\$, $p < 0,001$; \$\$\$\$, $p < 0,0001$: indiquent des différences significatives en fonction de la présence ou non, des microglies.



Article 2, Figure 5 : Conséquences de l'ablation génétique de la microglie sur l'activité locomotrice des embryons scn1Lab. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Tracés des distances parcourues par les embryons contrôles (N = 148), scn1Lab-KD (N = 184), contrôles sans microglies (N = 45) et scn1Lab-KD sans microglies (N = 288) (de droite à gauche). La vitesse de nage est représentée selon le code couleur suivant: le noir représente une vitesse faible, le vert une vitesse intermédiaire et le rouge une forte vitesse. (C) Quantification de la distance totale parcourue par les embryons pendant les 30 minutes d'enregistrement. (D) Quantification du temps passé par les embryons en position immobile (D_1) et en nage à faible (D_2) moyenne (D_3) et grande vitesse (D_4). N = nombre de larves. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$: indique une différence statistique entre les génotypes. \$\$\$, $p < 0,001$; \$\$\$\$, $p < 0,0001$: indiquent des différences significatives en fonction de la présence ou non, des microglies.

$p < 0,001$; \$\$\$\$, $p < 0,0001$: indiquent des différences significatives en fonction de la présence ou non, des microglies.

Troisième article. “La carbétocine, agoniste de l’ocytocine, réduit les crises d’épilepsie et leurs comorbidités dans le modèle *scn1Lab* du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre”

Alexandre Brenet, et al. & Nadia Soussi-Yanicostas

(En préparation)

Résumé de l’article

Le syndrome de Dravet est une épilepsie rare de l’enfant qui provoque des retards de développement majeurs, des déficits intellectuels et des troubles du comportement. Les approches thérapeutiques pour les patients atteints de ce syndrome restent à ce jour très limitées et se résument à une tentative de contrôle des crises. C’est pourquoi, nous avons tiré avantage du modèle *scn1Lab* qui reproduit les caractéristiques principales du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre, pour trouver de nouveaux traitements efficaces pour ce syndrome, mais aussi pour d’autres formes d’épilepsies. Sur la base de notre hypothèse que les crises d’épilepsie induisent une neuroinflammation microgliale chronique qui est néfaste pour la maladie et pour son évolution, nous avons voulu essayer de moduler l’activation des cellules microgliales et observer les conséquences sur les crises. Sur la base des travaux précédents de l’équipe, nous avons choisi de tester les effets de la carbétocine, un agoniste stable du récepteur de l’ocytocine. Nous avons tout d’abord montré que la carbétocine modifie la morphologie des cellules microgliales dans le modèle *scn1lab-KD*, suggérant un effet sur leur activité. Nous avons ensuite montré que la carbétocine réduit les phénotypes locomoteurs de type hyperactif et diminue l’excitabilité neuronale ainsi que la mort cellulaire. Enfin, l’étude de la balance synaptique, a montré que la carbétocine atténue les déséquilibres en faveur de l’excitation qui sont induits par l’inactivation du gène *scn1Lab*. Ainsi, notre étude montre que la carbétocine est une molécule candidate d’un grand intérêt pour atténuer les crises d’épilepsie, voire, pour prévenir leur apparition, dans le syndrome de Dravet.

Introduction

Comme il a été montré dans l’article précédent, les cellules microgliales présentent un phénotype activé dans le modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre, et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Comme les cytokines pro-inflammatoires ont un effet aggravant connu sur les crises d’épilepsie, ces résultats suggèrent que la neuroinflammation pourrait être à l’origine de l’aggravation des crises d’épilepsie. Dès lors, nous avons cherché à

savoir si la modulation de l'activité des cellules microgliales pouvait conduire à une diminution des crises épileptiques. Sur la base des travaux précédents de l'équipe qui montrent que la carbétocine est capable de moduler l'activité des cellules microgliales et, tout particulièrement, de réduire leur comportement neuro-inflammatoire (Mairesse et al. 2019), nous avons voulu tester son effet dans notre modèle du syndrome de Dravet chez le poisson zèbre.

Résultats

La carbétocine rétablit la répartition des trois populations de cellules microgliales chez les embryons *scn1Lab-KD*

Nous avons voulu étudier l'effet du traitement à la carbétocine sur la morphologie des cellules microgliales et leur répartition dans les différentes sous-populations identifiées précédemment. Nous avons donc produit des embryons *scn1Lab-KD* dans la lignée transgénique Tg[mpeg1:mcherryF], que nous avons traité avec la carbétocine à partir de 2 jpf avant de photographier leur cerveau avec un microscope confocal à 4 jpf (**Article 3, Figure 1A**). Les observations montrent que les microglies des embryons *scn1Lab-KD* possèdent, comme attendu, un corps cellulaire un plus volumineux, ainsi que des prolongements raccourcis et en plus petit nombre (**Article 3, Figure 1C**), comparées avec les microglies issues du cerveau des embryons contrôles (**Article 3, Figure 1B**). D'une manière intéressante, lorsque les embryons *scn1Lab-KD* sont traités avec la carbétocine, les cellules microgliales retrouvent une morphologie un peu plus ramifiée, ressemblant à la morphologie des cellules des embryons contrôles (**Article 3, Figure 1E**). La quantification des paramètres morphologiques confirme les observations précédentes et montre une diminution de la sphéricité (*scn1Lab-KD* : $0,621 \pm 0,006$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $0,552 \pm 0,005$; $p < 0,0001$) (**Article 3, Figure 1F**), une augmentation du nombre de prolongements (*scn1Lab-KD* : $5,2 \pm 0,2$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $6,1 \pm 0,2$; $p < 0,01$) (**Article 3, Figure 1G**), une augmentation de la longueur totale (*scn1Lab-KD* : $81 \pm 3 \mu\text{m}$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $107 \pm 3 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) et moyenne de ces prolongements (*scn1Lab-KD* : $19,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $21,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$) (**Article 3, Figure 1H, 1I**), ainsi qu'une augmentation de l'indice de ramification (*scn1Lab-KD* : $1,67 \pm 0,04$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $1,92 \pm 0,04$; $p < 0,001$) (**Article 3, Figure 1J**). Il est intéressant de souligner que ces valeurs sont, par ailleurs, similaires aux valeurs des microglies issue des embryons contrôles (sphéricité : $0,574 \pm 0,004$

; nombre de prolongements : $6,2 \pm 0,2$; longueur totale des prolongements : $109 \pm 3 \mu\text{m}$; longueur moyenne d'un prolongement : $22,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$; indice de ramification : $1,94 \pm 0,04$). De plus, la quantification de la ramification des cellules microgliales par l'analyse de Sholl, confirme que le traitement avec la carbétocine restaure une ramification importante des prolongements microgliaux (**Article 3, Figure 1K**). Enfin nous avons réalisé une analyse de clustering afin d'étudier la répartition des microglies dans les trois populations identifiées dans l'article précédent : « ramifiées », « transitionnelles » et « amiboïdes » (**Article 3, Figure 1M**). Cette analyse montre que la diminution de la proportion des microglies dites « ramifiées », chez les embryons *scn1Lab-KD*, est abolie par le traitement à la carbétocine (*scn1Lab-KD* : $11,8 \pm 3,2\%$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $29,0 \pm 2,7\%$; $p < 0,01$) (**Article 3, Figure 1L**). De même, la carbétocine corrige l'augmentation du pourcentage des microglies dites « amiboïdes » (*scn1Lab-KD* : $30,2 \pm 5,2\%$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $13,1 \pm 1,5\%$; $p < 0,01$) (**Article 3, Figure 1O**). D'une manière globale, la carbétocine rétablit la répartition des populations microgliales observée chez les embryons contrôles (cellules ramifiées : $26,3 \pm 3,4\%$; cellules amiboïdes : $10,8 \pm 1,3\%$).

La carbétocine rétablit l'activité locomotrice des embryons *scn1Lab-KD* à un niveau basal

Après avoir montré l'effet de la carbétocine sur la morphologie des cellules microgliales dans les embryons *scn1Lab-KD*, nous avons étudié les conséquences de ce traitement sur l'activité locomotrice des larves. Nous avons donc produit des embryons *scn1Lab-KD*, que nous avons traité à la carbétocine avant d'enregistrer leur activité locomotrice à 4 jpf (**Article 3, Figure 2A**). L'observation et la quantification de la distance totale parcourue par les embryons montrent que le traitement à la carbétocine permet de réduire significativement l'augmentation de l'activité locomotrice des embryons *scn1Lab-KD* (*scn1Lab-KD* : $155 \pm 8 \text{ mm}$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $98 \pm 7 \text{ mm}$; $p < 0.0001$) (**Article 3, Figure 2B-C**). Une analyse plus détaillée de la durée passée par les embryons dans plusieurs vitesses de nage montre que le traitement la carbétocine rétablit une activité locomotrice semblable à celle des embryons contrôles, avec de longues périodes d'inactivité ou de nage à faible vitesses, et peu de temps de nage à moyenne et haute vitesses (**Article 3, Figure 2D**). Ainsi, le traitement des embryons avec la carbétocine permet de réduire l'activité locomotrice des embryons *scn1Lab-KD*.

La carbétocine réduit l'hyperexcitabilité neuronale des embryons *scn1Lab-KD*

Dans la continuité de l'étude des conséquences du traitement à la carbétocine sur les crises épileptiformes des embryons *scn1Lab-KD*, nous avons cherché à confirmer que la diminution de l'activité locomotrice observée était liée à une diminution de l'hyperexcitation neuronale des embryons. Pour cela, nous avons injecté le morpholino *scn1Lab^{AUG}* dans les embryons de la lignée transgénique Tg[HuC:GCaMP5G] qui exprime un marqueur calcique fluorescent. Nous avons ensuite traité les embryons avec une solution de carbétocine 8 μM à partir de 2 jpf, et l'enregistrement des influx calciques dans les neurones des embryons a été réalisé à 4 jpf (**Article 3, Figure 3A**). L'analyse des signaux calciques confirme tout d'abord que la perte de fonction du gène *scn1Lab* induit une augmentation du nombre d'événements comme nous l'avons montré précédemment, et montre surtout que la carbétocine diminue significativement le nombre des événements calciques (**Article 3, Figure 3B**). La quantification de la fréquence des événements calciques montre une réduction de 57% du nombre d'événements par heure dans les embryons *scn1Lab-KD* traités avec la carbétocine comparé à ceux non traités (*scn1Lab-KD* : $30,6 \pm 1,7$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $21,9 \pm 2,3$; $p < 0,01$) (**Article 3, Figure 3C**), qui se rapproche de l'activité observée chez les embryons contrôles ($15,3 \pm 1,1$). Ainsi, ces résultats montrent qu'un traitement avec la carbétocine réduit les crises épileptiformes précoces dans notre modèle *scn1Lab-KD*.

Le traitement à la carbétocine réduit la mort cellulaire cérébrale des embryons *scn1Lab-KD*

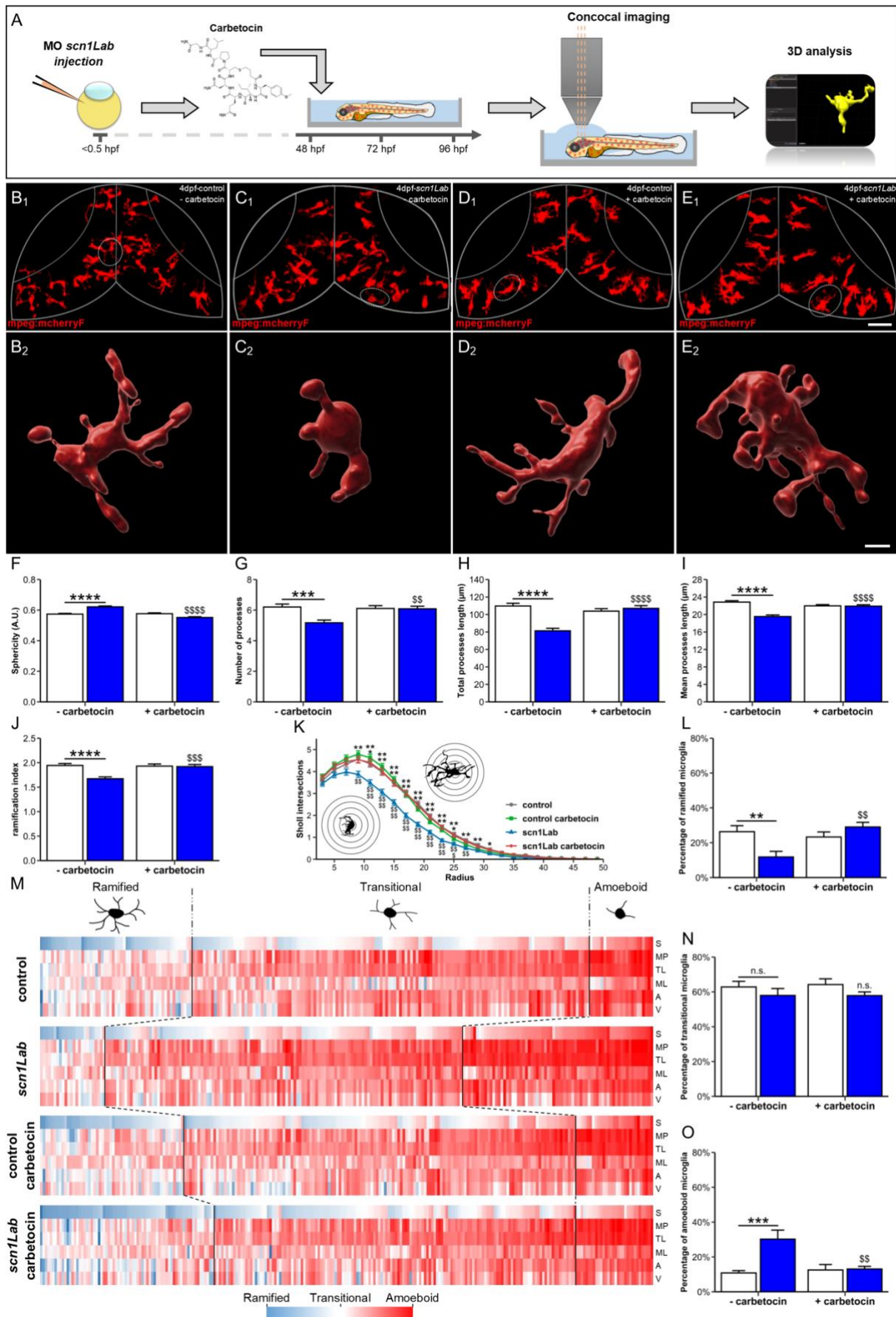
Comme montré dans le premier article, les embryons *scn1lab-KD* présentent un excès de mort cellulaire cérébrale qui pourrait être, soit une conséquence directe de la perte de fonction du gène *scn1Lab*, soit une conséquence de l'hyperexcitation des neurones. Comme la carbétocine réduit cette activité, nous avons voulu savoir si elle pouvait réduire la mort cellulaire dans le cerveau des embryons. Pour ce faire, nous avons produit des embryons *scn1Lab* que nous avons traités avec la carbétocine à partir de 2 jpf, pendant deux jours, avant de les incuber dans une solution d'acridine orange à 4 jpf (**Article 3, Figure 4A**). Les embryons ont ensuite été photographiés avec un microscope confocal (**Article 3, Figure 4B**) et le nombre de cellules marquées par l'acridine orange a été quantifié. Cette étude montre une diminution de la mort cellulaire des embryons *scn1Lab* traités avec la carbétocine (*scn1Lab-KD* : $48,7 \pm 0,6$ vs *scn1Lab-KD* avec carbétocine : $35,2 \pm 0,9$; $p < 0,0001$), des valeurs proches de celles observées chez les embryons contrôles ($34,5 \pm 0,9$) (**Article 3, Figure 4C**). Afin de confirmer les

résultats des marquages à l'acridine orange, nous avons ensuite réalisé des immunodétections de la forme activée de la protéine Caspase-3, un marqueur de l'apoptose, dans le cerveau des embryons *scn1Lab* traités ou non, à la carbétocine et âgés de 4 jpf (**Article 3, Figure 4D**). La quantification du nombre de cellules exprimant la forme activée de la protéine Caspase-3 confirme la diminution de la mort cellulaire dans le cerveau des embryons *scn1Lab* traités avec la carbétocine (*scn1Lab*-KD : $31,0 \pm 1,8$ vs *scn1Lab*-KD avec carbétocine : $23,6 \pm 0,8$; $p < 0,001$), avec des niveaux proches de ceux observés chez les embryons contrôles ($20,4 \pm 1,1$) (**Article 3, Figure 4E**). Ainsi, ces résultats montrent que la carbétocine est capable de réduire la mort cellulaire cérébrale suggérant que celle-ci est directement provoquée par l'hyperexcitation des neurones dans les embryons *scn1Lab*-KD.

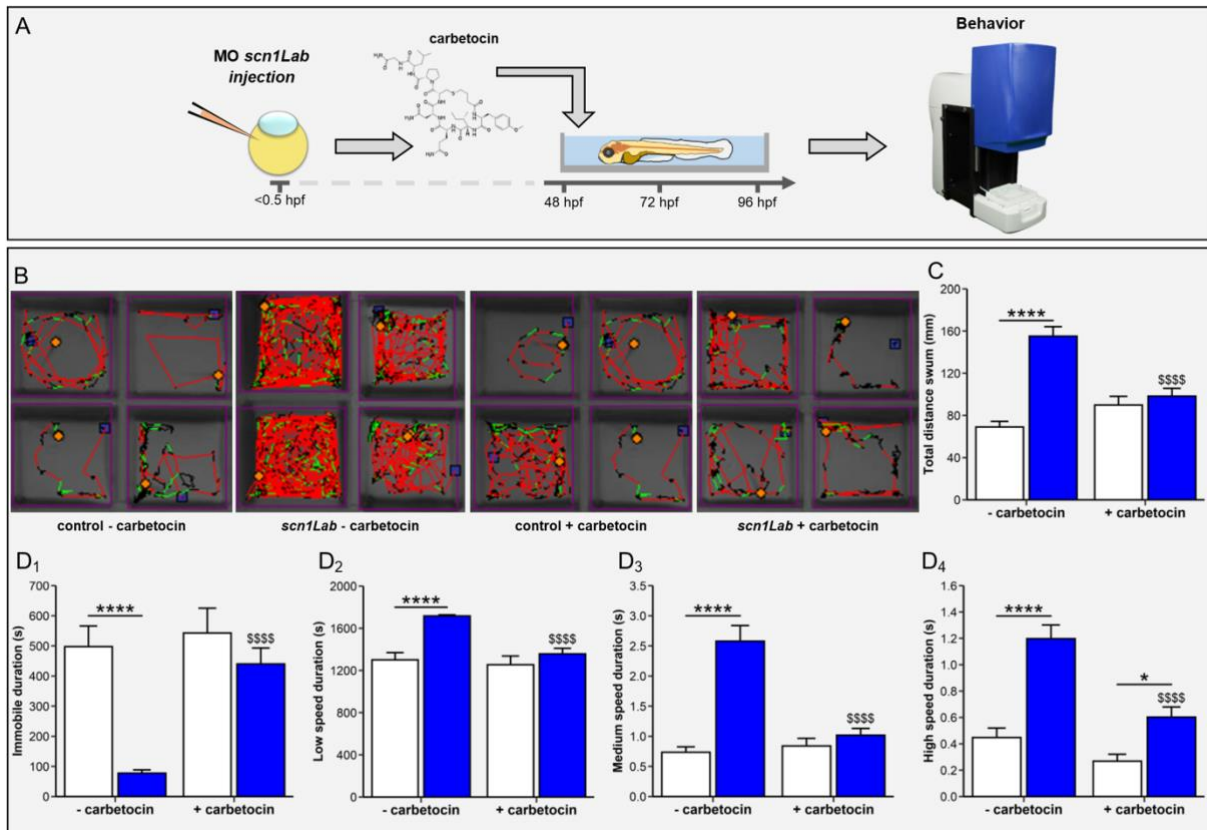
La carbétocine restaure la densité des synapses excitatrices dans le modèle *scn1Lab*-KD

Enfin, nous avons voulu déterminer si la carbétocine peut corriger le déséquilibre de la balance synaptique excitation/inhibition induit par la perte de fonction du gène *scn1Lab* que nous avons mis en évidence dans le premier article (Brenet et al. 2019). Pour cela, nous avons produit des embryons *scn1Lab*-KD, que nous avons traité avec la carbétocine à partir de 2 jpf avant de réaliser l'immunomarquage de la protéine PSD95 à 4 jpf. Cette protéine contribue au maintien de l'organisation moléculaire des récepteurs postsynaptiques des synapses excitatrices et en est donc marqueur spécifique de ces synapses (**Article 3, Figure 5A**). De manière intéressante, en plus de confirmer l'augmentation de l'accumulation de la protéine PSD95 chez les embryons *scn1Lab*-KD, cette étude montre que la carbétocine réduit très significativement ce déséquilibre (**Article 3, Figure 5B**). En effet, la quantification de la densité de *puncta* PSD95 dans le neuropile du tectum optique des embryons de 4 jpf (**Article 3, Figure 5C**) montre que le traitement à la carbétocine réduit significativement l'accumulation de la protéine PSD95 dans les embryons *scn1Lab*-KD (*scn1Lab*-KD : $0,375 \pm 0,030$ *puncta*/mm² vs *scn1Lab*-KD avec carbétocine : $0,263 \pm 0,028$ *puncta*/mm² ; $p < 0,05$), similaire à la densité observée chez les embryons contrôles ($0,224 \pm 0,028$ *puncta*/mm²) (**Article 3, Figure 5D**). Ainsi, ces résultats montrent que la carbétocine peut corriger les défauts moléculaires induits par la perte de fonction du gène *scn1Lab*.

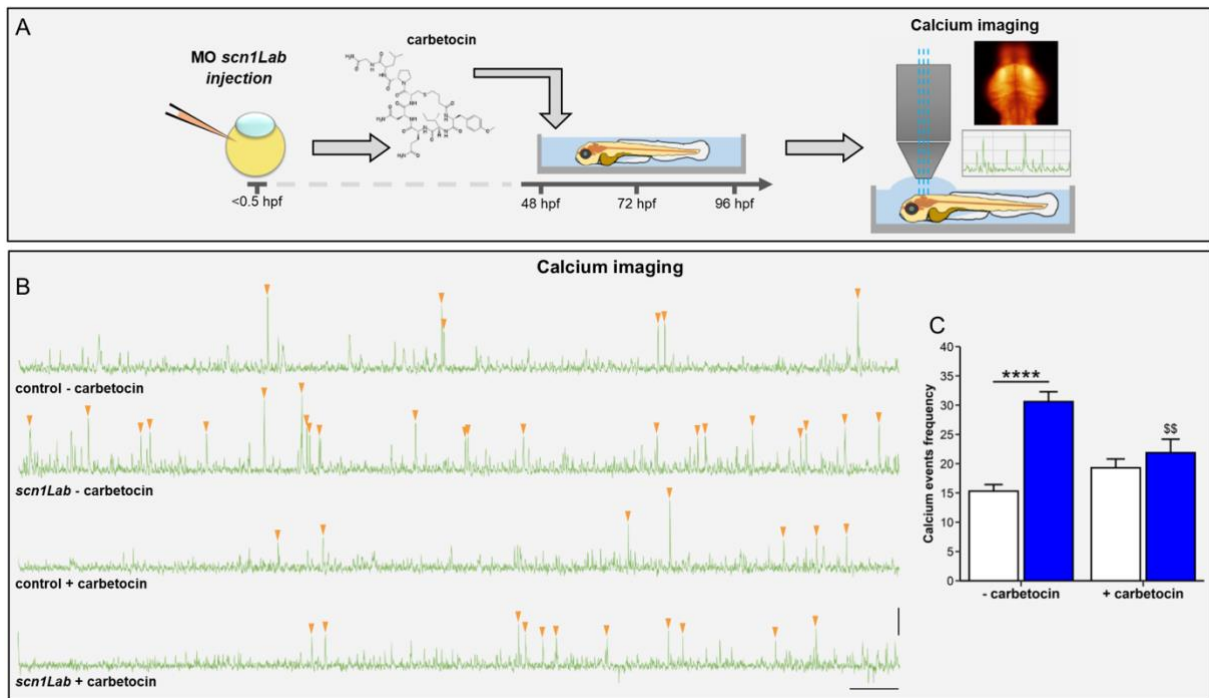
Figures



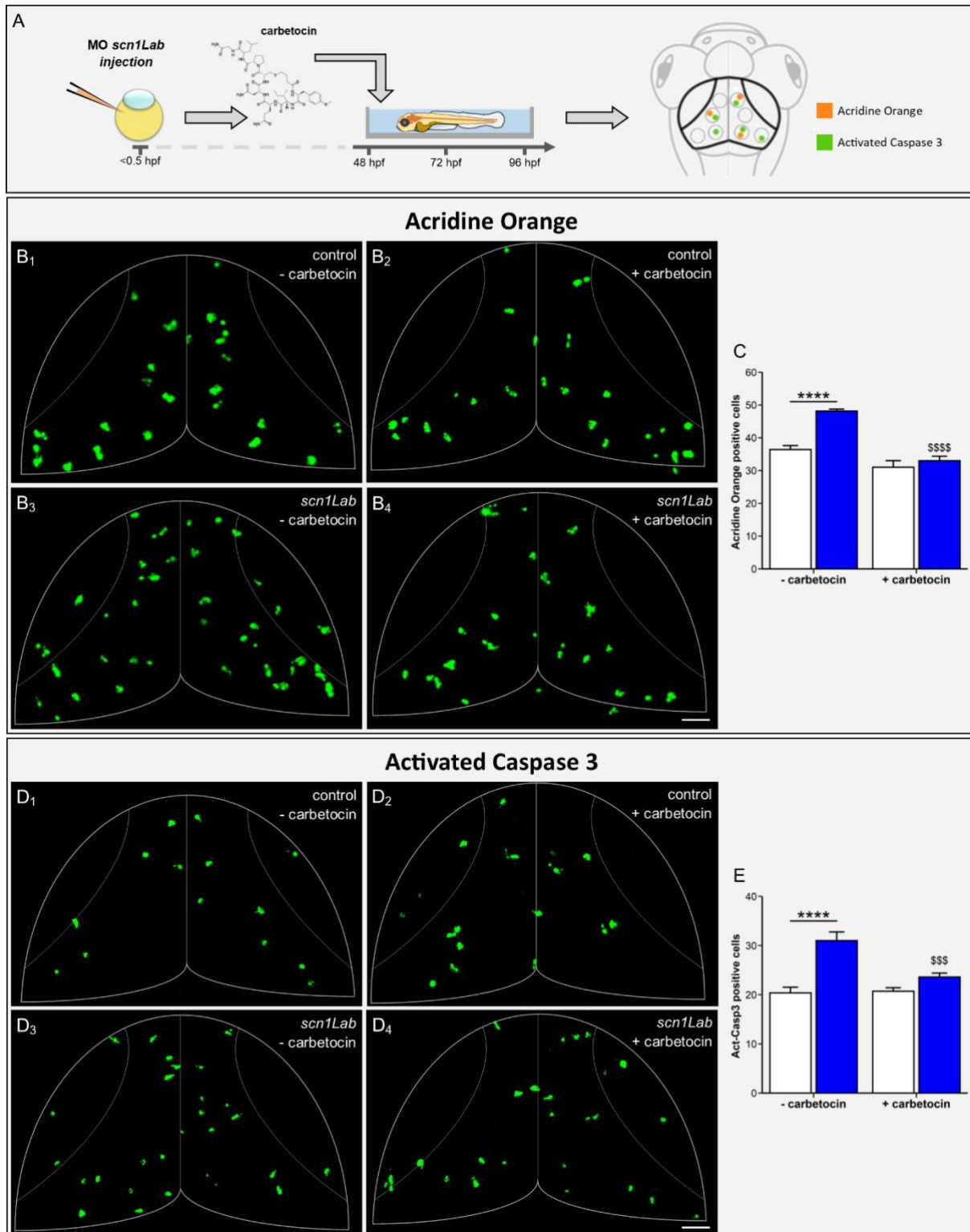
Article 3, Figure 1 : La carbétocine abolit les changements morphologiques de la microglie chez les embryons *scn1Lab-KD*. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B-E) Vues dorsales du cerveau des embryons transgéniques *Tg[mpeg1:mcherryF]* âgés de 4 jpf contrôles (B), *scn1Lab-KD* (C), contrôles traités avec la carbétocine (D) et *scn1Lab-KD* traité avec la carbétocine (E), et, montrant la morphologie des cellules microgliales (B₁, C₁, D₁, E₁) ainsi que des reconstructions en 3D des microglies issues du cerveau d'un embryon de chacune des quatre conditions (B₂, C₂, D₂, E₂). (F-J) Quantification des paramètres morphologiques de la microglie : la sphéricité (F), le nombre de prolongements (G), la longueur totale des prolongements (H), la longueur moyenne d'un prolongement (I) et l'indice de ramification (J), chez les embryons contrôles (N = 11 ; n = 220) et *scn1Lab-KD* (N = 11 ; n = 225) et dans les deux mêmes contextes génétiques, mais traités à la carbétocine (contrôles : N = 11 ; n = 230 et *scn1Lab-KD* : N = 11 ; n = 255). (K) Analyse de Sholl de la ramification des microglies d'embryons contrôles (noir), *scn1Lab-KD* (bleu), contrôles avec carbétocine (vert) et *scn1Lab-KD* avec carbétocine (rouge). (L, N, O) Répartition des trois populations de microglies: ramifiées (L), transitionnelles (N) et amiboïde (O), chez les embryons contrôles et *scn1Lab-KD*, traités ou non, avec la carbétocine. (M) Analyse par cluster des populations microgliales issues d'embryons *scn1Lab-KD* et contrôles, traité ou non, à la carbétocine, et âgé de 4 jpf. Cette analyse a été réalisée en utilisant les paramètres suivants : sphéricité (S), nombre de prolongements (MP), longueur totale (TL) et moyenne (ML) de ces derniers, et surface (A) et volume (V) des microglies. Échelles (B₁, C₁, D₁, E₁) : 50 µm ; (B₂, C₂, D₂, E₂) : 10 µm. N = nombre de larves photographiées et n = nombre de microglies analysées. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Tous les graphiques représentent la moyenne ± sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. n.s., non significatif ; **, p < 0,01 ; ***, p < 0,001 ; ****, p < 0,0001 : indiquent des différences statistiques entre les génotypes. n.s., non significatif ; \$\$, p < 0,01 ; \$\$\$, p < 0,001 ; \$\$\$\$, p < 0,0001 : indiquent des différences significatives pour le traitement à la carbétocine.



Article 3, Figure 2 : La carbétocine réduit l'hyperexcitation locomotrice des embryons *scn1Lab-KD*. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Tracés des distances parcourues par les embryons contrôles (N = 58), *scn1Lab-KD* (N = 68), contrôles avec carbétocine (N = 49) et *scn1Lab-KD* avec carbétocine (N = 63) (de droite à gauche). La vitesse de nage est représentée par un code couleur: le noir représente des vitesses faibles ; le vert, la vitesse intermédiaire ; et le rouge, une vitesse élevée. (C) Quantification de la distance totale parcourue par les embryons pendant les 30 minutes d'enregistrement. (D) Quantification du temps passé par les embryons en position immobile (D₁), ou en mouvement à faible (D₂), vitesse (D₃) et à grande vitesse (D₄). N = nombre de larves. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,0001$: indiquent des différences statistiques entre les génotypes. \$\$\$\$, $p < 0,0001$: indique une différence significative en fonction du traitement, ou non, à la carbétocine.

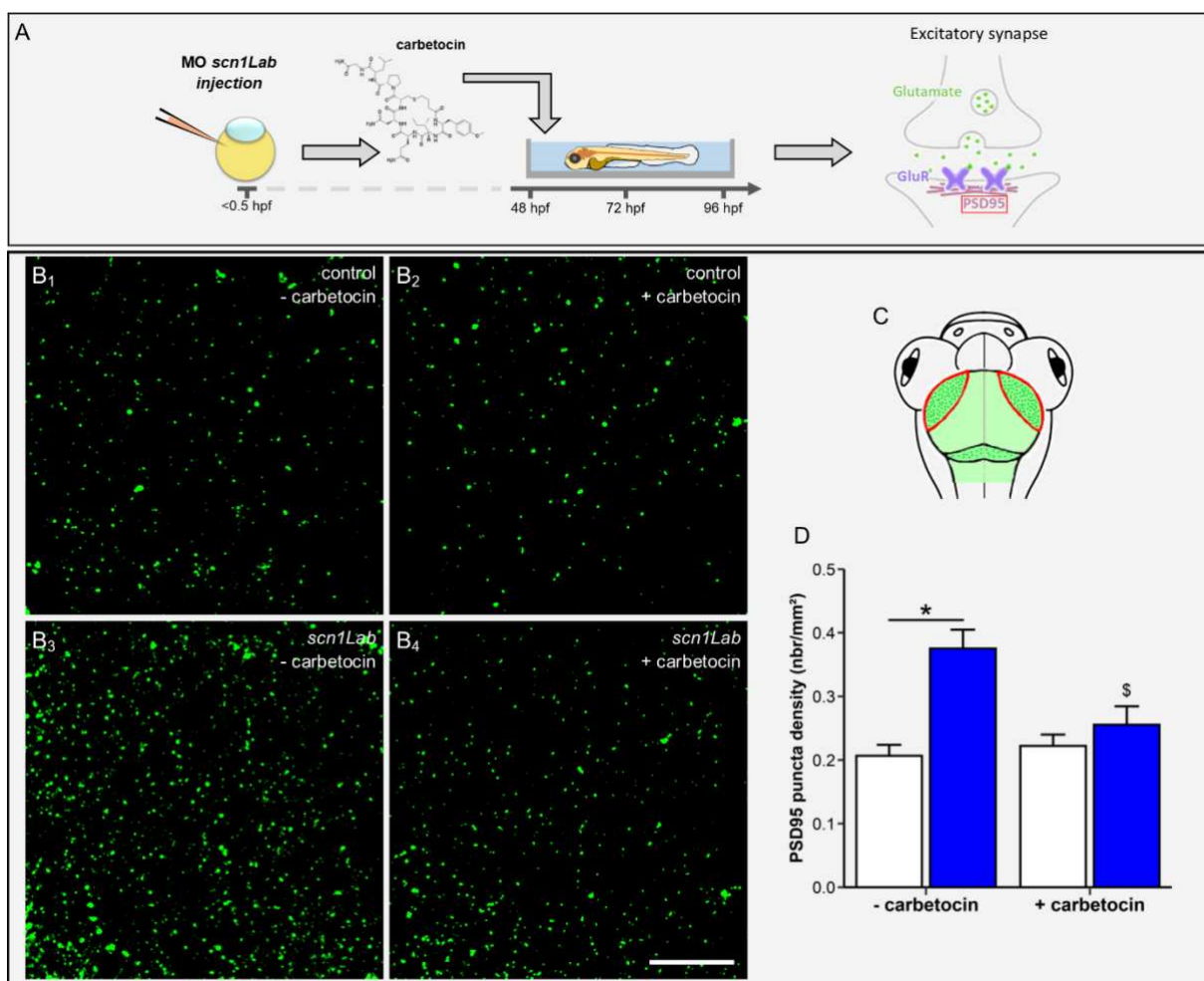


Article 3, Figure 3 : La carbétocine réduit l'hyper excitabilité neuronale des embryons *scn1Lab-KD*. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Graphiques représentant l'activité calcique des neurones des embryons contrôles (N = 14), *scn1Lab-KD* (N = 18), contrôles avec carbétocine (N = 17) et *scn1Lab-KD* avec carbétocine (N = 18) (de haut en bas), âgés de 4 jpf. (C) Quantification de la fréquence des événements calciques. Échelles : 0,04 $\Delta F/F_0$ et 2 min. N = nombre de larves. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. ****, $p < 0,0001$: indique une différence statistique entre les génotypes. \$\$, $p < 0,01$: indique une différence significative en fonction du traitement, ou non, à la carbétocine.



Article 3, Figure 4 : La carbétocine réduit la mort cellulaire dans le cerveau des embryons *scn1Lab-KD*. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Vue dorsale des embryons contrôles (B₁) (N = 12), *scn1Lab-KD* (B₂) (N = 14), contrôles avec carbétocine (B₃) (N = 15) et *scn1Lab-KD* avec carbétocine (B₄) (N = 17), âgés de 4 jpf et colorés avec l'acridine orange. (C) Quantification du nombre cellules marquées par l'acridine orange. (D) Vue dorsale du cerveau

disséqué des embryons contrôle (D_1) (N = 8), *scn1Lab*-KD (D_2) (N = 10), contrôle avec carbétocine (D_3) (N = 10) et *scn1Lab*-KD avec carbétocine (D_4) (N = 10), âgés de 4 jpf et marqués avec l'anti corps anti-Caspase-3-activée. (E) Quantification du nombre cellules exprimant la Caspase-3 activée. Échelle : 30 μ m. N = nombre de larves. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x/eau d'une ouverture numérique de 0,75. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. ****, $p < 0,0001$: indique une différence statistique entre les génotypes. \$\$\$, $p < 0,001$; \$\$\$\$, $p < 0,0001$: indiquent des différences significatives en fonction du traitement, ou non, à la carbétocine.



Article 3, Figure 5 : La carbétocine abolit le déséquilibre de la balance synaptique des embryons *scn1Lab*-KD. (A) Schéma décrivant le protocole expérimental. (B) Immunodétection de la protéine PSD95 sur des coupes de 20 μ m de cerveau d'embryons contrôle (B_1) (N = 3 ; n = 8), *scn1Lab*-KD (B_2) (N = 4 ; n = 13), contrôle avec carbétocine (B_3) (N = 4 ; n = 14) et *scn1Lab*-KD avec carbétocine (B_4) (N = 3 ; n = 14). (C) Schéma de la vue dorsale d'un embryon âgé de 4

jpgf et montrant la zone d'intérêt en rouge. **(D)** Quantification de la densité des puncta de PSD95 dans les neuropiles du tectum optique des embryons contrôles (blanc) et *scn1Lab-KD* (bleu) âgés de 4 *jpgf*. N = nombre de larves et n = nombre de coupes analysées. Toutes les images ont été acquises grâce à un microscope confocal Leica SP8 équipé d'un objectif 63x/huile d'une ouverture numérique de 1,4. Tous les graphiques représentent la moyenne \pm sem. Les p-values ont été calculées par une two-way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey. *, $p < 0,05$: indique une différence statistique entre les génotypes. \$, $p < 0,05$: indique une différence significative en fonction du traitement, ou non, à la carbétocine.

Quatrième article. “Organophosphorus diisopropylfluorophosphate intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death”

Alexandre Brenet*, Julie Somkhit*, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Christiane Romain, Olivier Bar, Alexandre Igert, Dominique Saurat, Nicolas Taudon, Gregory Dal-Bo, Florian Nachon, Nina Dupuis, & Nadia Soussi-Yanicostas

* : co-premier auteurs

Publié le 4 Octobre 2019 dans le journal **Scientific Reports** (IF : 3,998)

doi : 10.3390/cells8101199

Résumé de l'article

Les organophosphorés (OPs) sont des composés largement utilisés comme insecticides dans l'agriculture moderne, mais aussi comme armes de guerre. Leur utilisation dans la vie quotidienne conduit à de plus en plus d'intoxications graves. Ainsi, le but de ce travail est de modéliser un empoisonnement aux OPs chez le poisson zèbre afin d'étudier les modifications moléculaires et cellulaires induites par ces molécules. Afin de modéliser cet empoisonnement, nous avons traité les embryons avec du diisopropylfluororophosphate (DFP), un organophosphoré largement utilisé à cet effet. L'exposition des larves de poisson zèbre au DFP provoque assez rapidement l'inhibition de l'acétylcholinestérase, ce qui induit une paralysie des larves du côté périphérique, et des crises épileptiformes du côté centrale ; reproduisant les caractéristiques principales d'un empoisonnement aux OPs. Nous avons profité de ce modèle pour explorer les conséquences de cet empoisonnement sur la structure moléculaire et cellulaire du cerveau. Nous avons, en premier lieu, observé que l'exposition au DFP induit une augmentation de la mortalité cellulaire cérébrale, potentiellement causée par l'augmentation de l'excitabilité neuronale. Dans second temps, nous avons montré que le DFP induit une réorganisation moléculaire importante dans le cerveau des larves exposées. En effet, ces dernières montrent une augmentation des marqueurs synaptiques excitateurs pour une diminution des marqueurs inhibiteurs. Ces modifications conduisent alors à un défaut de la balance excitation/inhibition dans le cerveau des larves, en faveur de l'excitation, pouvant être à l'origine de l'apparition des crises d'épilepsie. Dès lors, ce modèle d'empoisonnement aux OPs peut permettre de caractériser les modifications cellulaires et moléculaires, au cours du temps, induites par l'empoisonnement et menant à l'installation des crises d'épilepsie. Ce modèle peut aussi contribuer à la découverte de nouveaux antidotes efficace contre ce type d'empoisonnement.



OPEN

Organophosphorus diisopropylfluorophosphate (DFP) intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death

Alexandre Brenet^{1,4}, Julie Somkhit^{1,4}, Rahma Hassan-Abdi¹, Constantin Yanicostas¹, Christiane Romain¹, Olivier Bar¹, Alexandre Igert², Dominique Saurat³, Nicolas Taudon³, Gregory Dal-Bo², Florian Nachon², Nina Dupuis^{2,5} & Nadia Soussi-Yanicostas^{1,5}✉

With millions of intoxications each year and over 200,000 deaths, organophosphorus (OP) compounds are an important public health issue worldwide. OP poisoning induces cholinergic syndrome, with respiratory distress, hypertension, and neuron damage that may lead to epileptic seizures and permanent cognitive deficits. Existing countermeasures are lifesaving but do not prevent long-lasting neuronal comorbidities, emphasizing the urgent need for animal models to better understand OP neurotoxicity and identify novel antidotes. Here, using diisopropylfluorophosphate (DFP), a prototypic and moderately toxic OP, combined with zebrafish larvae, we first showed that DFP poisoning caused major acetylcholinesterase inhibition, resulting in paralysis and CNS neuron hyperactivation, as indicated by increased neuronal calcium transients and overexpression of the immediate early genes *fosab*, *junBa*, *npas4b*, and *atf3*. In addition to these epileptiform seizure-like events, DFP-exposed larvae showed increased neuronal apoptosis, which were both partially alleviated by diazepam treatment, suggesting a causal link between neuronal hyperexcitation and cell death. Last, DFP poisoning induced an altered balance of glutamatergic/GABAergic synaptic activity with increased NR2B-NMDA receptor accumulation combined with decreased GAD65/67 and gephyrin protein accumulation. The zebrafish DFP model presented here thus provides important novel insights into the pathophysiology of OP intoxication, making it a promising model to identify novel antidotes.

Organophosphorus (OP) compounds comprise highly poisonous substances widely used as chemical pesticides but also as warfare agents. As a result of their massive use for agricultural purposes worldwide, OP poisoning represents a major public health issue with 3 million severe intoxications reported annually and more than 200,000 deaths, primarily suicides^{1–4}. OPs are potent inhibitors of cholinesterases, including acetylcholinesterase (AChE), whose blockade causes a massive accumulation of acetylcholine and overstimulation of cholinergic receptors (ChRs) at both neuromuscular junctions and CNS cholinergic synapses⁵. In the brain, ChR hyperactivation causes epileptic seizures, which if not rapidly treated, may develop into life-threatening *status epilepticus* (SE)⁶. Besides their immediate toxicity, OPs also cause long-term neurological comorbidities, such as psychomotor deficits and recurrent seizures^{7,8}. Existing countermeasures combine ChR agonist atropine with an AChE reactivator such as 2-PAM, often associated with γ -aminobutyric acid receptor (GABAR) agonist diazepam (DZP). These treatments are lifesaving, but do not reverse brain damage or prevent subsequent occurrence of seizures

¹NeuroDiderot, Inserm, Université de Paris, 75019 Paris, France. ²Département de toxicologie et risques chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), 91 220 Brétigny-sur-Orge, France. ³Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Unité de Développements Analytiques et Bioanalyse, 91 220 Brétigny-sur-Orge, France. ⁴These authors contributed equally: Alexandre Brenet and Julie Somkhit. ⁵These authors jointly supervised this work: Nina Dupuis and Nadia Soussi-Yanicostas. ✉email: nadia.soussi@inserm.fr

or psychomotor deficits, emphasizing the need for new, more potent antidotes. To meet this need, an animal model of OP poisoning that would faithfully reproduce the consequences of OP intoxication in humans and be amenable to drug screening would help achieve a better understanding of the pathophysiology of OP poisoning and identify therapeutic entities counteracting the harmful effects of these compounds. Although it has long been known that acute OP intoxication causes neuropathological changes in the brain^{8–11}, the precise nature of these changes and their extent remain under-researched.

Here, we describe a zebrafish model of OP poisoning and characterize the neuron defects induced by acute intoxication. Over the past decade, besides its rapidly expanding use as a human disease model^{12–16}, the zebrafish has become one of the leading animal models for toxicology research and drug discovery¹⁷. The zebrafish is a versatile, powerful and easy-to-breed vertebrate model that offers significant advantages for in vivo drug screening and neurotoxicology investigations. These advantages include a CNS that displays an overall organization similar to that of mammals with full conservation of the different neuronal and glial cell types and all neurotransmitters^{18–22}. To model OP poisoning in zebrafish, we chose DFP, an OP analogue of the warfare agent sarin, but less volatile and much less dangerous, that has been widely used as a prototypic OP in toxicology research. In particular, previous studies in rodents have shown that acute DFP poisoning causes potent AChE inhibition, inducing epileptic seizures, neuronal death, memory impairment and neuroinflammation^{9,23}.

To better understand the physiopathology of OP poisoning and subsequent neuronal deficits, we combined behavioral analysis and in vivo recording of neuronal calcium transients with molecular and immunocytochemical approaches. Our data showed that zebrafish larvae exposed to DFP displayed major inhibition of AChE activity correlated with reduced motor activity. DFP poisoning also induced CNS hyperexcitation as shown by both the large increase in the number of calcium transients in brain neurons and the overexpression of the immediate early genes (IEGs) *fosab*, *junBa*, *npas4b*, and *atf3*, transcription factor encoding genes which are transcribed to high levels in the very first hours that follow neuron excitation and epileptic seizures^{24,25}. In addition to epileptiform seizures, DFP exposure also caused an increased neuronal apoptosis, both partially mitigated by diazepam administration, suggesting that the increased neuronal apoptosis was a direct consequence of neuronal hyperexcitation. Last, DFP poisoning caused increased NR2B-NMDA subunit receptor accumulation combined with decreased accumulation of both GAD65/67 and gephyrin proteins, suggesting that DFP exposure promotes epileptiform neuronal hyperexcitation as a result of a shift in the glutamatergic/GABAergic balance activity toward glutamate-mediated excitation.

The zebrafish model of DFP poisoning faithfully reproduces the neuronal deficits observed in both humans and rodents exposed to DFP, and also provides interesting new insights into the neurotoxicity of OP agents, making it a promising tool to identify novel, more potent antidotes.

Results

Larvae exposed to DFP showed increased mortality, reduced motility and AChE inhibition. In order to study DFP toxicity, 5 days post-fertilization (dpf) larvae were exposed to DFP and several classic features of OP poisoning were assessed (Fig. 1a). First, we determined DFP toxicity in zebrafish, by exposing 5 dpf larvae to increasing concentrations of DFP (15, 20, 30 and 50 μ M) and recording larval survival over a 6 h period. Results showed that all larvae exposed to either 30 μ M or 50 μ M died during the 6 h incubation period and displayed major morphological defects, such as curved tails and shorter body length, whereas 50% of those exposed to 20 μ M died and showed mild morphological defects (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1). As we aimed at investigating brain damage associated with mid-acute DFP toxicity, we selected the concentration of 15 μ M, which causes a larval lethality of 20% (LC20) and no visible phenotypic defects in surviving larvae. We also checked that DFP was not hydrolyzed during the 6 h incubation time and results showed that DFP diluted in fish water (FW) was almost stable with an average loss of 2% per hour, approximately (Fig. 1c). Then, we analyzed the phenotype of larvae exposed to 15 μ M DFP for 6 h and we observed no phenotypic defects in surviving larvae (Fig. 1d–h), except a slight reduction of body length (Fig. 1i). Histopathological analysis also indicated that following a 6 h exposure to 15 μ M DFP, surviving larvae did not show any visible histological abnormalities in the brain (Supplementary Fig. 2).

As AChE inhibition is the key hallmark of OP poisoning, we next measured AChE activity in larvae exposed to 15 μ M DFP, and we observed a 50% decrease in AChE activity as early as 2 h after DFP addition, worsening to 25% residual activity from 4 h exposure onwards (Fig. 1j). We next investigated whether the decreased AChE activity was correlated with the paralysis of the larvae. Results showed that DFP-treated larvae displayed a markedly decreased locomotor activity compared to control larvae as early as 2 h after DFP addition, as indicated by the distance traveled by larvae, which was recorded using a Zebrabox (ViewPoint) automated device (Fig. 1k). Thus, after DFP exposure, zebrafish larvae displayed reduced motor activity as the likely result of a massive AChE inhibition.

DFP exposure induced neuronal hyperexcitation. Increased transcription of the IEG *c-Fos* in brain neurons has been repeatedly observed following epileptic seizures²⁶. As a first investigation of the consequences of DFP poisoning on neuronal activity, we therefore studied, by immunocytochemistry, the accumulation of the Fosab protein, the zebrafish orthologue of c-Fos, in the brain of DFP-treated and control larvae (Fig. 2a,b). Results clearly indicated that DFP-treated larvae displayed a highly significant increase in the number of neurons expressing Fosab ($p < 0.0001$) in both the optic tectum (Fig. 2c–e), and telencephalon (Supplementary Fig. 3). To further investigate whether DFP exposure induces overexpression of other IEGs, we analyzed, by qRT-PCR, the expression in the brain of *fosab*, *atf3*, *junBa*, *npas4a*, and *npas4b*, the zebrafish orthologues of *C-FOS*, *JUNB*, *ATF3*, and *NPAS4*, respectively, four genes that are expressed at high levels in the very first hours that follow epileptic seizures in pharmacological models of epilepsy in rats²⁵. Interestingly, qRT-PCR showed a significant

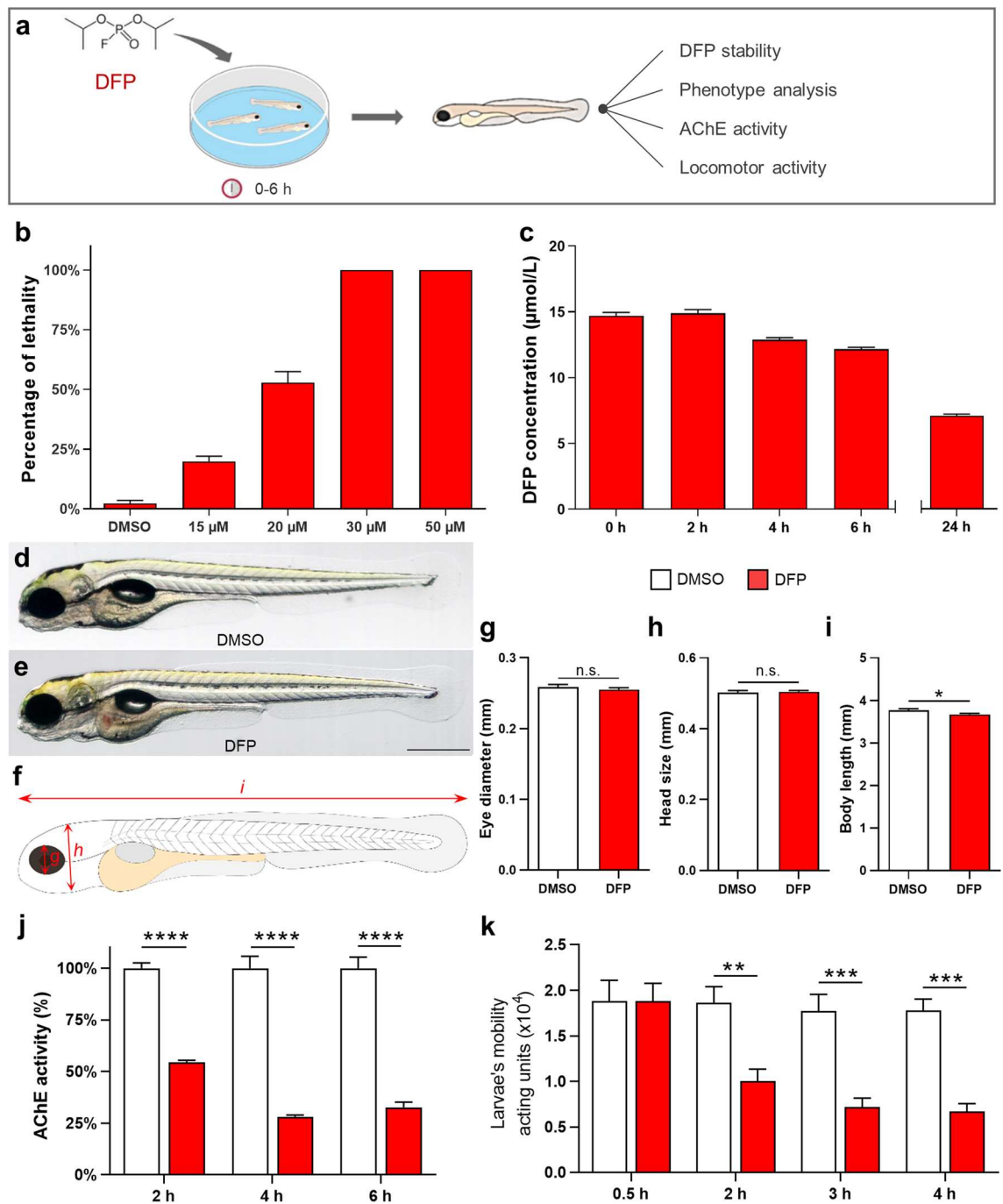


Figure 1. DFP-exposed zebrafish larvae displayed reduced motility and AChE inhibition. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to 15, 20, 30 or 50 μM DFP or vehicle (1% DMSO) and larval lethality, phenotypic defects, motor activity, and AChE activity were studied during the next 6 h. (b) Lethality rates of 5 dpf larvae exposed for 6 h to 15, 20, 30 or 50 μM DFP and selection of 15 μM DFP as optimal concentration (LC20). (c) Residual concentrations of DFP measured at different time points from a 15 μM solution diluted in fish water (E3 medium). (d,e) Morphology of 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle (d) or 15 μM DFP (e). (f) Scheme depicting measurements of zebrafish larva morphology. (g–i) Quantification of eye diameter (g), head size (h) and body length (i) in larvae exposed for 6 h to either vehicle ($n=26$) or 15 μM DFP ($n=26$) (Student's unpaired t -test: n.s., non-significant; *, $p < 0.05$). (j) Quantification of AChE activity in larvae exposed to 15 μM DFP ($n=5$) or vehicle ($n=5$), for 2, 4, and 6 h (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: ****, $p < 0.0001$). (k) Motor activity of 5 dpf larvae exposed to either 15 μM DFP ($n=44$) or vehicle ($n=12$) (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

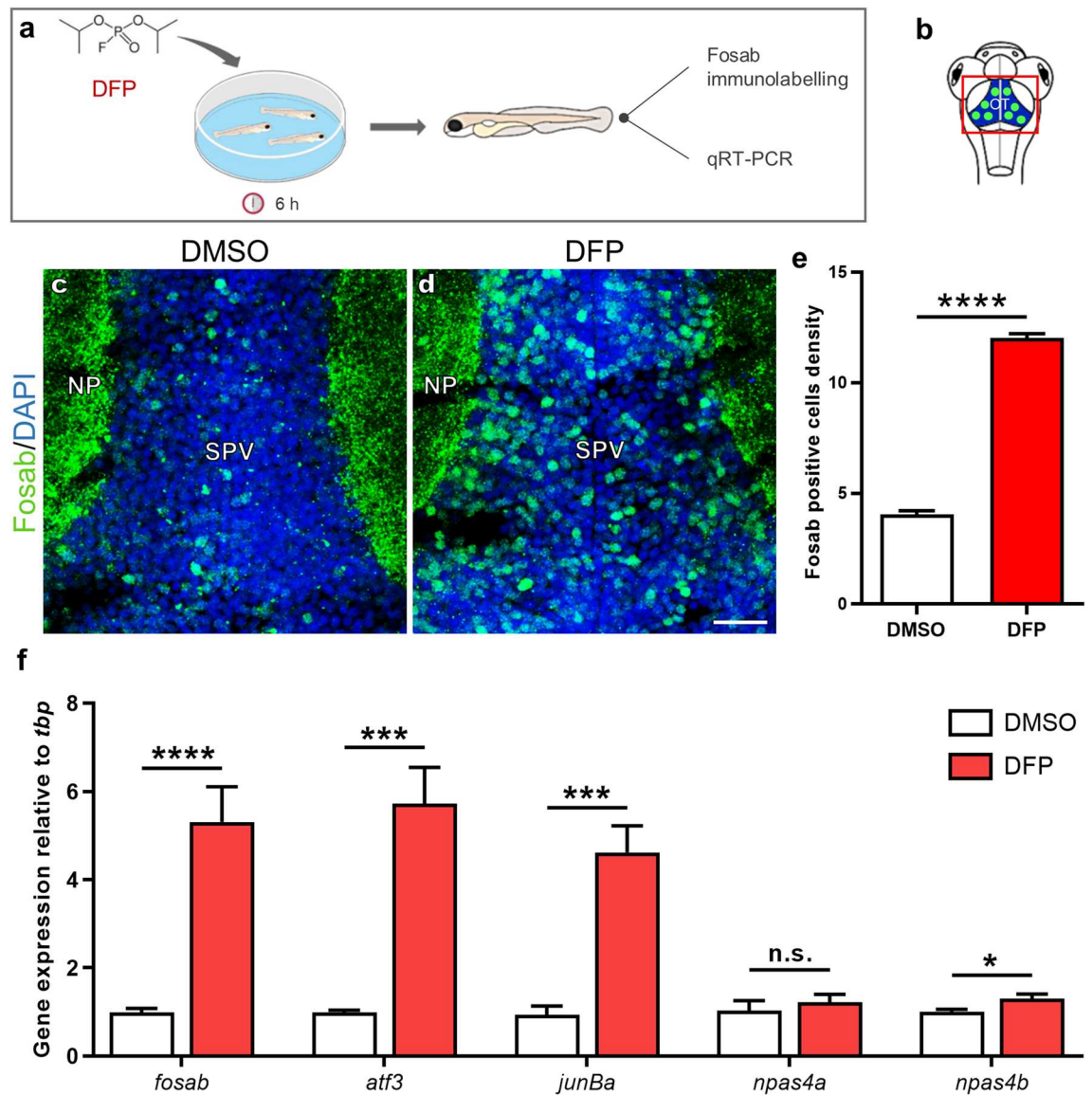


Figure 2. DFP exposure induces overexpression of the IEGs *fosab*, *atf3*, *junBa*, and *npas4b*. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed for 6 h to either 15 μ M DFP or vehicle (1% DMSO) before processing for either Fosab immunostaining or brain dissection followed by RNA extraction and qRT-PCR analysis. (b) Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). (c,d) Fosab immunolabeling of optic tectum neurons in 5 dpf larvae exposed to either vehicle (c) or 15 μ M DFP (d). Scale bar: 20 μ m. (e) Quantification of Fosab-expressing neuron density in the optic tectum of 5 dpf larvae exposed to either vehicle ($N=3$; $n=8$) or 15 μ M DFP ($N=3$; $n=11$) (unpaired *t*-test: ****, $p < 0.0001$). (f) qRT-PCR analysis of the accumulation of *fosab*, *atf3*, *junBa*, *npas4a* and *npas4b* RNAs relative to that of *tbp* in 5 dpf larvae exposed to either vehicle ($n=6$) or 15 μ M DFP ($n=6$) (Student's unpaired *t*-test: n.s., non-significant; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). N = number of larvae and n = number of slices. Abbreviations: NP, neuropil; SPV, stratum periventriculare.

increase in the accumulation of *fosab* (control: 0.989 ± 0.088 vs. DFP: 5.305 ± 0.804 ; $p < 0.0001$), *junBa* (control: 0.938 ± 0.197 vs. DFP: 4.619 ± 0.603 ; $p < 0.001$), *atf3* (control: 0.993 ± 0.047 vs. DFP: 5.723 ± 0.603 ; $p < 0.003$), and *npas4b* (control: 1.007 ± 0.054 vs. DFP: 1.294 ± 0.109 ; $p < 0.05$), in larvae exposed to DFP when compared to that observed in controls (Fig. 2f), suggesting that DFP exposure causes neuronal hyperexcitation. Note that expression of the second zebrafish orthologue of NPAS4, *npas4a*, did not change following DFP exposure (control: 1.03 ± 0.228 vs. DFP: 1.226 ± 1.175 ; $p = 0.5$) (Fig. 2f).

We then sought to visualize the increased neuronal activity in larvae exposed to DFP using calcium imaging (Fig. 3a,b), a technique that fully reflects neuronal activity in zebrafish epilepsy models in vivo^{14,27}. Five dpf larvae from the transgenic line Tg[Huc:GCaMP5G] were treated with DFP or vehicle (DMSO) and calcium transients were recorded during the following 6 h using time-lapse confocal microscopy (Supplementary Videos 1 and 2). Interestingly, in DFP-treated larvae, we observed numerous intense calcium transients, from approximately

1 h post-exposure onward, which were highly reminiscent of those seen in zebrafish genetic epilepsy models¹⁴. Moreover, these calcium transients were mostly seen in the neuropil region, where a large number of synaptic connections occur (Fig. 3c–f). Quantification of calcium fluorescence signals confirmed that as early as 1 h after DFP addition, massive calcium transients were detected in DFP-treated larvae (Fig. 3g). We also observed a significant increase in the frequency of the calcium transients from 2 h post-exposure onward (Fig. 3h). Importantly, 3 h after DFP exposure, all larvae displayed numerous massive calcium transients, which were never observed in control larvae, strongly suggesting that zebrafish larvae exposed to acute DFP poisoning display massive neuronal hyperexcitation reminiscent of epileptic seizures. Diazepam (DZP), a GABA receptor agonist of the benzodiazepine family and a component of existing OP cocktail antidotes²⁸, is a well-known inhibitor of neuronal excitation. We therefore checked whether administration of DZP was able to mitigate the increased number and intensity of calcium transients seen in DFP-exposed larvae. Data showed that massive calcium transients seen in larvae exposed for 5 h to 15 μM DFP were markedly reduced in the minutes that followed the addition of 40 μM DZP (Fig. 3i,j), suggesting that the zebrafish DFP model faithfully reproduces the pathophysiology of OP poisoning in humans.

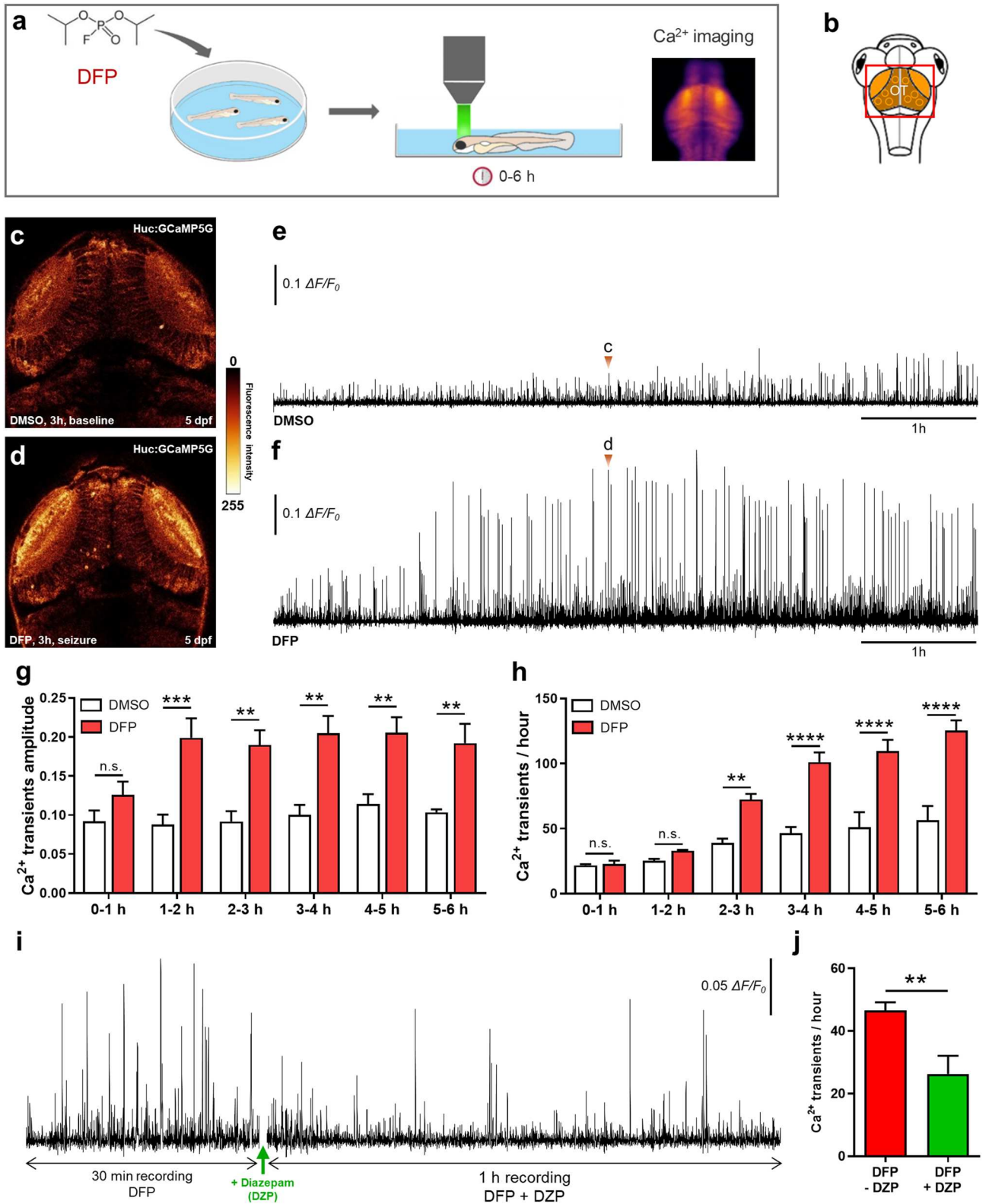
DFP exposure induces increased cell apoptosis. Exposure to warfare OP nerve agents, such as soman, sarin, or VX, causes massive neuronal loss in both humans and animal models^{29–33}. We therefore examined whether DFP exposure also caused increased cell death, using both *in vivo* acridine orange (AO) staining, a vital marker that labels fragmented DNA during late apoptosis stages, and immunodetection of activated-caspase-3 (Act-casp3), a marker of mid-early apoptosis stages (Fig. 4a,b). Interestingly, DFP-exposed larvae displayed a significantly increased number of neurons expressing Act-casp3 compared to that observed in controls (Fig. 4c–e). In addition, *in vivo* AO labeling confirmed that DFP exposure caused an increased cell apoptosis (Fig. 4f–i). We then investigated whether the increased number of apoptotic cells seen in DFP-treated larvae was a direct consequence of neuronal hyperexcitation. To this end, 5 dpf larvae were co-treated for 6 h with 15 μM DFP and 40 μM DZP, and cell apoptosis was visualized by AO labeling. Results indicate that DZP was able to partially alleviate DFP-induced cell apoptosis (Fig. 4h,i), strongly suggesting a link between neuronal hyperexcitation and cell death.

Increased NR2B-NMDA subunit receptor expression and decreased GAD65/67 and gephyrin protein accumulation in DFP exposed larvae. It has been shown that following OP exposure, neuronal seizures are associated with both an increased glutamatergic response and excessive NMDA receptor activation^{34–36}. To examine whether accumulation of the NR2B-NMDA subunit receptor, a component of the main excitatory glutamate receptor, was modified following DFP exposure, brain sections of larvae exposed to DFP or controls were analyzed by immunocytochemistry using an anti-NR2B-NMDA antibody (Fig. 5a,b). Interestingly, results showed a clear increase in the accumulation of NR2B-NMDA protein in the tectal neuropil of DFP-exposed larvae, compared to that seen in controls (Fig. 5c,d). Moreover, the DFP-induced increased NR2B-NMDA accumulation at excitatory synapses was confirmed by quantification of synaptic puncta in the tectal neuropil (Fig. 5e). We also analyzed the synaptic protein gephyrin, which is a scaffolding protein expressed at the inhibitory post-synaptic terminals (Fig. 5a,f). Quantification of this labeling showed a marked decrease in gephyrin synaptic puncta density in the tectal neuropil in DFP-exposed larvae compared to controls (Fig. 5g–i). In contrast no NR2B-NMDA or gephyrin immunolabeling were observed in cell bodies of the stratum periventricular (Supplementary Fig. 4). To further characterize brain reorganization induced by DFP exposure, we analyzed, by immunohistochemistry, the accumulation of glutamate decarboxylase 65/67 (GAD65/67), the enzymes involved in GABA synthesis, the main inhibitory transmitter (Fig. 5a,j). Interestingly, quantification of immunolabeling signals indicated that DFP-treated larvae displayed markedly decreased accumulation of GAD65/67 proteins (Fig. 5k–m). Altogether, these results strongly suggest that DFP exposure induces neuronal hyperexcitation as a result of simultaneous increased glutamatergic activity and decreased GABAergic signaling.

Discussion

Because of the widespread use of organophosphorus (OP) compounds for agricultural purposes and the lack of fully effective countermeasures, OP poisoning remains a major public health issue worldwide, with several million intoxications and over 200,000 deaths reported each year^{37,38}, emphasizing the need for fully efficient antidotes to alleviate OP toxicity. To help fill this gap, we used the possibilities offered by zebrafish larvae and developed a vertebrate model of OP poisoning to investigate the consequences of OP exposure on neuronal functions and neuronal network activity. As an OP compound, we chose DFP, a moderately toxic compound previously used for OP toxicology research³⁹. In good agreement with the results gained with rodent OP poisoning models^{6,40}, zebrafish larvae exposed to DFP displayed marked AChE inhibition and muscle paralysis, two important hallmarks of OP poisoning. More importantly, unlike rodent OP intoxication models, in which premature death due to respiratory failure must imperatively be prevented by the simultaneous addition of low dose atropine and oximes, there is no need to treat DFP-exposed zebrafish with acetylcholine modulators, making DFP-exposed zebrafish larvae an accurate animal model to investigate the pathophysiology of OP poisoning. In particular, as a pure OP poisoning model, zebrafish larvae also offer a powerful tool to test the effects of anti-convulsive agents or other OP antidotes, in the absence of either muscarinic antagonists or cholinesterase reactivators.

Previous results in both humans and rodent models have shown that acute OP poisoning causes neuronal hyperexcitation leading to epileptic seizures⁶. In good agreement with this observation, we first observed that zebrafish larvae exposed to DFP displayed a considerably increased accumulation of the Fos protein in brain neurons. *c-Fos* is a member of the IEG family, widely used as a molecular marker of neuronal activity, and



◀ **Figure 3.** DFP exposure caused neuronal hyperexcitation. **(a)** As experimental set-up, 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (1% DMSO), and calcium transients were recorded in brain neurons during the next 6 h. **(b)** Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). **(c,d)** Snapshot views of calcium imaging in a 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larva brain showing baseline calcium transients **(c** in Fig. 2e) and seizure-like hyperactivity seen 3 h after exposure to 15 μ M DFP **(d** in Fig. 2f). **(e,f)** Baseline calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] control larvae ($n=3$) **(e)** and massive calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 6 h to 15 μ M DFP ($n=4$) **(f)**. **(g)** Amplitude of calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae at different time points following exposure to either 15 μ M DFP ($n=4$) or vehicle ($n=3$) (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: n.s., non-significant; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). **(h)** Number of calcium transients showing $\Delta F/F_0 > 0.04$ in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae at different time points following exposure to either 15 μ M DFP ($n=4$) or vehicle ($n=3$) (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: n.s., non-significant; **, $p<0.01$; ****, $p<0.0001$). **(i)** Pattern of calcium transients seen in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 5 h to 15 μ M DFP and then to 15 μ M DFP + 40 μ M diazepam (DZP) for an additional hour. **(j)** Number of calcium transients showing $\Delta F/F_0 > 0.04$ in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 5 h to 15 μ M DFP and then to 15 μ M DFP + 40 μ M diazepam (DZP) for an additional hour ($n=6$) (Student's unpaired t -test: **, $p<0.01$).

overexpressed in a large number of animal epilepsy models^{41–43}, suggesting that acute DFP exposure causes neuronal hyperexcitation. Using qRT-PCR analysis we next showed that DFP exposure also induced a massive accumulation of transcripts of the IEGs *fosab*, *atf3*, *junBa*, and *npas4b*, providing another indication that DFP induces a massive neuronal hyperexcitation in zebrafish larvae. To further investigate whether DFP exposure causes neuronal hyperexcitation, we used calcium imaging, a recent technology that enables the visualization of neuronal excitation and epileptic seizures in living zebrafish larvae^{14,27,44}. Interestingly, in larvae exposed to acute DFP poisoning, we observed a massive increase in the number of neuronal calcium transients compared to those seen in controls, and also a significant increase in the amplitude of the transients in DFP-treated larvae. Last, these calcium transients detected in brain neurons of DFP-exposed larvae were significantly diminished after addition of diazepam, a GABA receptor agonist. Altogether, these observations demonstrate that after acute DFP poisoning, zebrafish larvae display epileptiform neuronal hyperexcitation. In humans suffering from acute OP intoxication, whenever neuronal hyperexcitation is not rapidly treated, epileptic seizures eventually develop into SE, a major life-threatening neurological condition^{6,45}, which also causes long-term brain damage^{46,47}. Interestingly, in the zebrafish model of OP poisoning presented here, we observed that almost all the larvae displayed numerous massive calcium transients from 2 to 3 h after DFP exposure onward, which were strongly reminiscent of those associated with generalized seizures seen in both genetic and pharmacological zebrafish epilepsy models^{14,27}. Altogether, these findings strongly suggest that DFP exposure causes epileptiform neuronal hyperexcitation in zebrafish larvae, eventually leading to a status epilepticus-like condition. This validated DFP model could be used to identify novel OP antidotes, and especially neuroprotective entities preventing the long-lasting neuronal morbidities associated with OP exposure. In particular, new AChE reactivators or other efficient countermeasures could be identified on the basis of their ability to restore locomotor activity or counteract epileptogenic effects of OP poisoning.

Together with AChE inhibition and epileptic seizures, massive neuronal death is another hallmark of OP poisoning²³ also observed in DFP-exposed zebrafish larvae, as demonstrated by acridine orange staining and Act-casp3 immunocytochemistry, two markers of late and mid-early apoptosis stages, respectively. Importantly, given that the number of Act-casp3 positive cells was approximately doubled only 6 h after OP addition, and that the cleavage of Pro-Caspase 3 into Act-casp3 is a mid-early stage event in the intrinsic apoptotic cascade, these data suggest that DFP-induced neuronal apoptosis is initiated in the very first hours that follow OP poisoning, a time frame also matching the massive calcium transients seen in DFP-treated individuals. Altogether, these results suggest that the increased rate of neuronal apoptosis seen in DFP-treated individuals was a consequence of glutamate excitotoxicity due to epileptiform neuronal hyperexcitation. Alterations in proteolytic cleavage of pro-caspase 1 and 3 have already been described in different experimental epilepsy models^{48,49}. However, the relationship between neuronal excitation, glutamate excitotoxicity and neuronal apoptosis remains poorly understood. At the cellular level, it has long been known that epileptiform neuronal hyperexcitation relies on massive glutamate releases, inducing glutamate receptor over-activation at glutamatergic excitatory synapses^{34–36}. In the case of OP poisoning, it has been shown that acute OP intoxication induces activation of NMDA receptors⁵⁰, which in turn causes neuronal seizures and apoptosis^{46,51}. Interestingly, in the model of OP poisoning presented here, hyperexcitation of brain neurons was correlated with both increased accumulation of the NR2B subunit of excitatory NMDA receptor and decreased accumulation of gephyrin and GAD65/67 proteins, two important components of GABAergic inhibitory signaling. These results suggest that after DFP poisoning, neuronal hyperexcitation is due to a shift in the glutamatergic/GABAergic activity balance of brain neurons toward excitatory states.

We report here on a zebrafish model of OP poisoning that faithfully recapitulates the neuronal deficits observed in humans, including AChE inhibition, epileptiform neuronal hyperexcitation, and neuronal apoptosis. Moreover, this vertebrate model does not require the simultaneous addition of acetylcholine modulators, unlike rodent models of OP poisoning, thus providing a pure and accurate model for large-scale in vivo screening of entities that could restore CNS functions after OP poisoning and alleviate the long-term neurological sequelae of such intoxication.

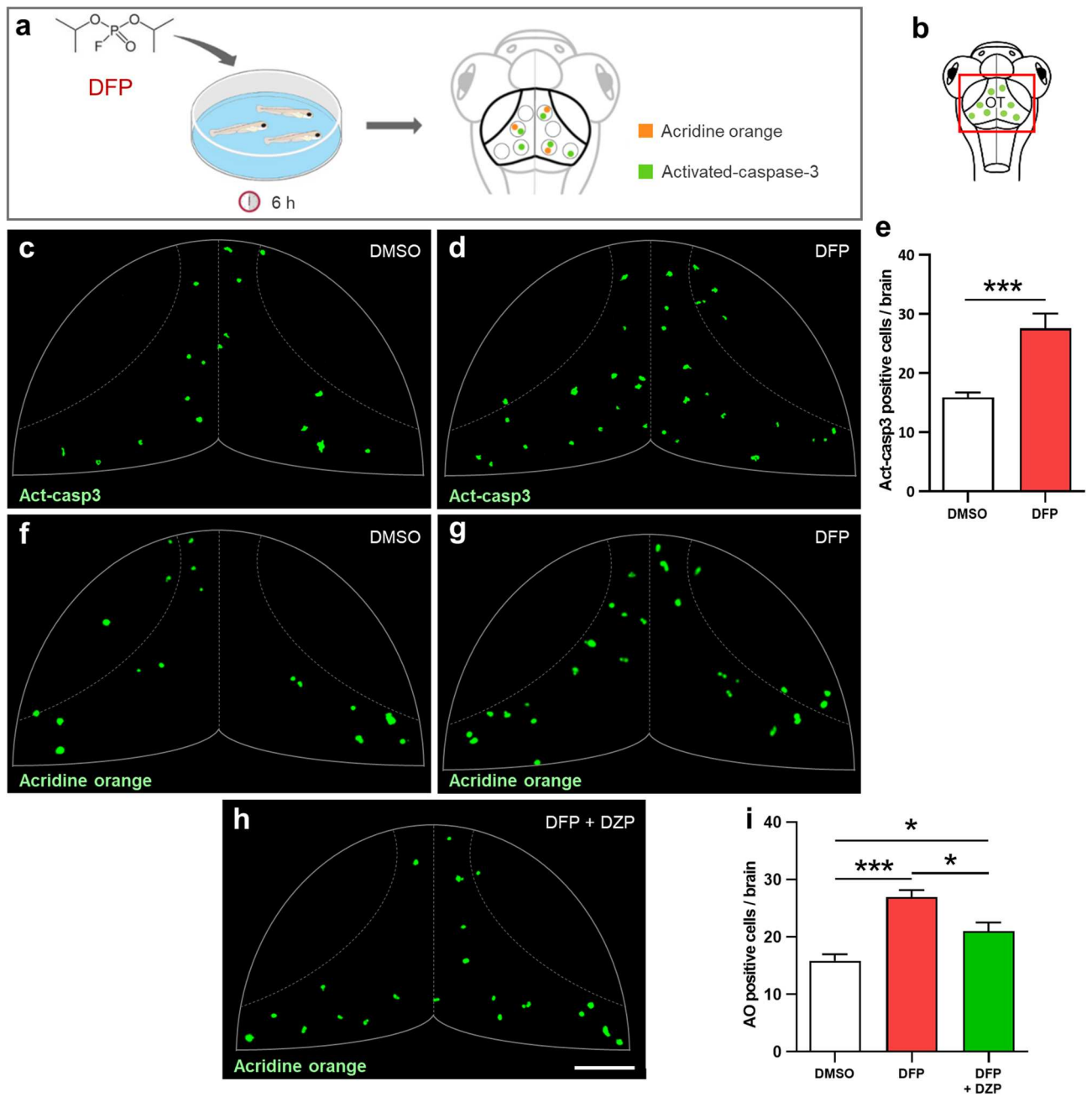


Figure 4. DFP exposure increased cell apoptosis. **(a)** As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μM DFP or vehicle (1% DMSO) for 6 h, before processing for either acridine orange (AO) staining or anti-activated caspase-3 (Act-casp3) immunolabeling. **(b)** Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). **(c,d)** Act-casp3 immunolabeling of OT neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle **(c)** or 15 μM DFP **(d)**. **(e)** Quantification of Act-casp3-positive neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either 15 μM DFP ($n = 12$) or vehicle ($n = 12$) (Student's unpaired *t*-test with Welch's correction: ***, $p < 0.001$). **(f-h)** Visualization of AO-labeled apoptotic neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle **(f)**, or 15 μM DFP **(g)** or 15 μM DFP + 40 μM diazepam **(h)**. **(i)** Quantification of the number of acridine orange positive cells in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle ($n = 24$), or 15 μM DFP ($n = 17$) or 15 μM DFP + 40 μM diazepam (DZP) ($n = 10$) (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Scale bar: 50 μm .

Materials and methods

Fish husbandry and zebrafish lines.

Zebrafish were kept at 26–28 $^{\circ}\text{C}$ in a 14 h light/10 h dark cycle. Embryos were collected by natural spawning and raised in E3 solution at 28.5 $^{\circ}\text{C}$. To inhibit embryo pigmentation, 0.003% 1-phenyl-2-thiourea was added at 1-day post-fertilization (dpf). Wild-type AB fish was originally purchased from the Zebrafish International Resource Center (Eugene, OR, USA) and Tg[HuC:GCaMP5G] transgenic line⁵² was a gift from Dr. George Debréguas (Laboratoire Jean Perrin, Paris). These lines were raised

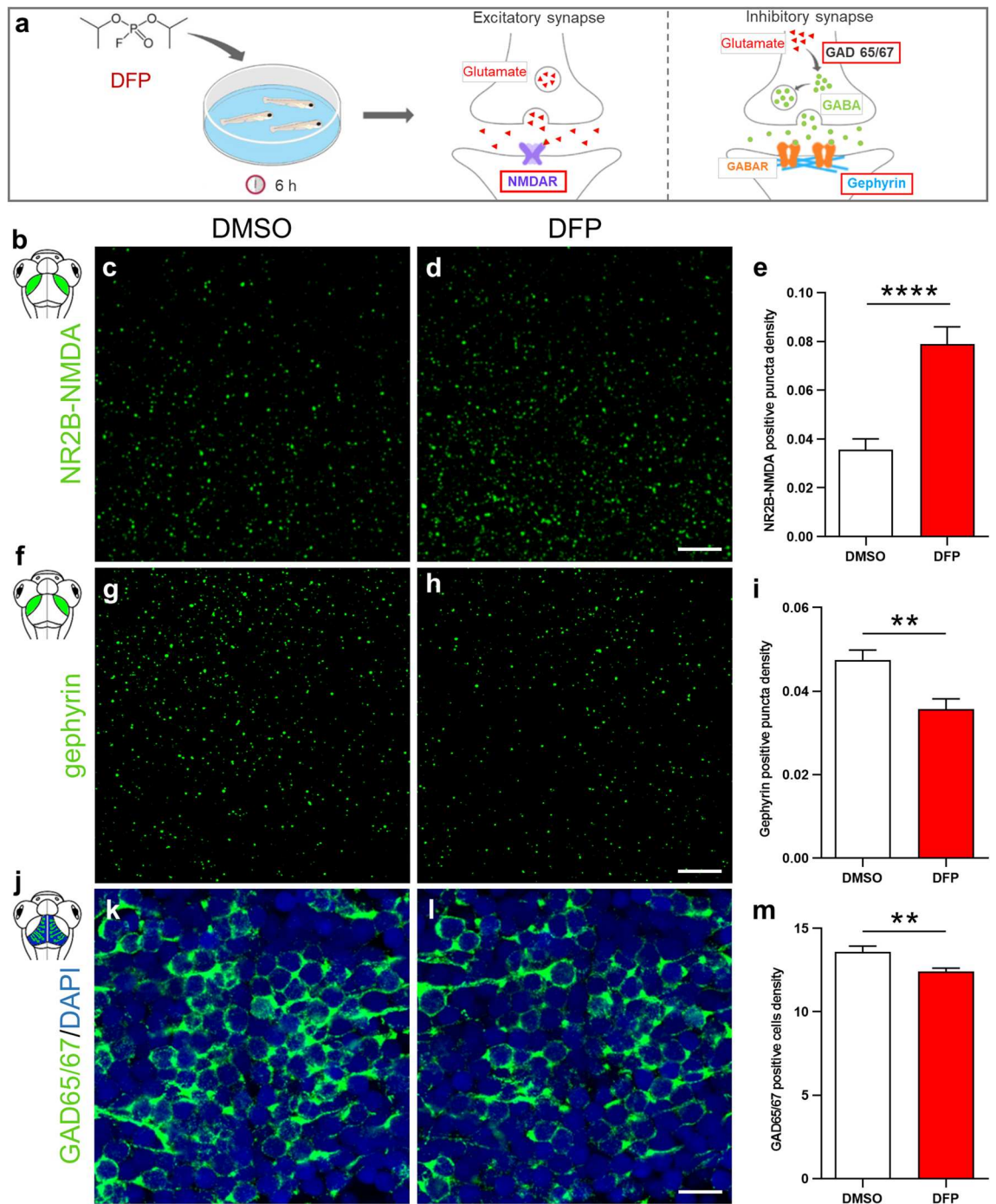


Figure 5. DFP exposure caused increased NR2B-NMDA subunit receptor accumulation combined with decreased gephyrin and GABA signaling. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (DMSO) for 6 h, prior to being processed for NR2B-NMDA, gephyrin or GAD 65/67 immunolabeling. (b) Scheme of 5 dpf larva head highlighting the tectal neuropils in green. (c,d) NR2B-NMDA receptor immunolabelling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO (c) or 15 μ M DFP (d). Scale bar: 5 μ m. (e) Quantification of NR2B-NMDA puncta density in 5 dpf larvae treated for 6 h with either DMSO ($N=4$; $n=22$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=26$) (Mann Whitney: ****, $p < 0.0001$). (f) Scheme of 5 dpf larva head highlighting the tectal neuropils in green. (g,h) Gephyrin immunolabelling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO (g) or 15 μ M DFP (h). Scale bar: 5 μ m. (i) Quantification of gephyrin puncta density in 5 dpf larvae treated for 6 h with either DMSO ($N=4$; $n=18$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=18$) (Student unpaired t -test: **, $p < 0.01$). (j) Scheme of 5 dpf larva head highlighting stratum periventriculare in blue and green. (k,l) GAD65/67 immunolabelling of neurons in the optic tectum of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO (k) or 15 μ M DFP (l). Scale bar: 10 μ m. (m) Quantification of the density of neurons expressing GAD65/67 protein in the optic tectum of 5 dpf larvae exposed to either DMSO ($N=4$; $n=18$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=19$) (Student unpaired t -test: **, $p < 0.01$). N =number of larvae and n =number of slices.

in our facility. All animal experiments were conducted at the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm), and were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

DFP treatment. Diisopropylfluorophosphate (DFP) was purchased from Sigma Aldrich. A stock solution (5.46 mM), stored at -20°C , was diluted extemporaneously to $15\ \mu\text{M}$ in 1% DMSO/E3 medium. Control zebrafish larvae were treated with 1% DMSO/E3 medium.

Measurement of DFP stability (see supplementary Materials & Methods).

Morphological analysis. Five dpf larvae were anesthetized and lateral views of the whole body were acquired using a Zeiss Stereomicroscope at the same magnification. Body length, eye size, and head size were then measured using ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Body length was measured from the anterior tip of the body to the caudal peduncle. Eye size and brain surface area were measured by specifying the eye and brain boundaries.

Hematoxylin/eosin staining (see supplementary Materials & Methods).

Measurement of AChE activity (see supplementary Materials & Methods).

Zebrafish larval locomotor activity. Larvae locomotor activity was measured, as previously described¹⁴, using a ZebraBox (View Point), an automated infrared tracking device, with ZebraLab 5.13.0.240 software (<https://www.viewpoint.fr/en/home>). Five dpf larvae were individually dispatched in a 96-well plate in approximately $200\ \mu\text{l}$ of E3 medium containing either 1% DMSO or $15\ \mu\text{M}$ DFP. The plate was then placed in the recording chamber for a 30-min habituation in the dark and in silence. Locomotor activity was then recorded for 4 h using the following settings: animal color was set to black and threshold detection to 12. The locomotion activity was quantified as the sum of all pixels showing intensity changes during the recording time and plotted as “acting units”.

qRT-PCR. For RNA isolation, larvae were homogenized using a syringe equipped with a 26G needle (7 larvae per sample) using the RNA XS Plus kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNAs were synthesized using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and qPCR was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Samples were run in triplicate. Expression levels were normalized to that of the *tbp* gene. The primers (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) used are listed in Supplementary Table 1.

Neuronal calcium transient imaging. Calcium activity was recorded and quantified as previously described in Brenet et al. (2019)¹⁴. Five dpf larvae were paralyzed using $300\ \mu\text{M}$ pancuronium bromide (PB) and embedded in 1.3% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottomed dish, and then covered with 3 mL of E3 solution containing $300\ \mu\text{M}$ PB. The recording chamber was then placed under a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a $20\times/0.75$ multi-immersion objective. Vehicle (1% DMSO) or DFP ($15\ \mu\text{M}$) was added to the E3 medium and calcium activity was recorded for 6 h. Calcium fluorescent signals were recorded on a single focal plan, located approximately in the middle of the optic tectum, at a 512×512 -pixel image resolution and a frame rate of 2 images per second. Fluorescence intensity of each frame was measured using a homemade macro on ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Fluorescence variations ($\Delta F/F_0$) were calculated using Microsoft Excel (for Windows 2013, version 15.0.4569.1506) by subtracting the mean fluorescence intensity of all frames (F_0) and dividing the results by F_0 . A subtraction of the mean value of the lowest (all values under the median) within a 20 s sliding window around the point was finally applied to correct the fluorescence drift occurring during long calcium recordings. Fluorescence variations greater than $0.04\ \Delta F/F_0$ were considered as calcium events upon visual confirmation since the detection system may detect false events.

Diazepam treatment. 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae were exposed to $15\ \mu\text{M}$ DFP for 5 h, PB-paralyzed and embedded in 1.1% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottomed dish, and then covered with an E3 solution containing $15\ \mu\text{M}$ DFP and $300\ \mu\text{M}$ PB. Calcium transients were first monitored for 30 min. Diazepam ($40\ \mu\text{M}$ DZP, Sigma) was then added and calcium transients were recorded for an additional hour. Visualization and recording of calcium transients were carried out as described above.

Acridine orange labeling of apoptotic cells. To quantify neuronal cell death, we used in vivo acridine orange (AO) staining of fragmented DNA molecules in apoptotic cells. Five dpf larvae treated with either vehicle or DFP were incubated for 30 min in AO (1/2000, VectaCell), thoroughly washed several times, PB-paralyzed and agar-embedded. $120\ \mu\text{m}$ stacks of brain sections were then acquired using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a $20\times/0.75$ multi-immersion objective. In addition to AO staining, brains were stained with anti-activated-caspase-3 and processed as previously described¹⁴ (see supplementary Materials & Methods).

Immunohistochemistry (see also Supplementary Table 2 for details on antibodies used). For protein immunodetection, zebrafish larvae were fixed in 4% formaldehyde, incubated overnight in 15% sucrose

at 4 °C, embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose solution, flash frozen in isopentane at –45 °C and stored at –80 °C until use. For gephyrin immunodetection, unfixed larvae were directly incubated for 30 min in 15% sucrose at room temperature and then embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose solution, flash frozen in isopentane at –45 °C and stored at –80 °C until use. Frozen embedded larvae were cut into 20 µm cryostat sections. For Fosab staining, we strictly applied the protocol described by Chatterjee et al. (2015)⁵³. For anti-GAD65/67 and anti-gephyrin immunolabeling, we used the endogenous biotin blocking procedure (Avidin/Biotin Blocking Kit, Dako, code No. X0590) according to the manufacturer's instructions. Sections were then blocked and permeabilized with 0.2% gelatine, 0.25% Triton X100 diluted in 1X PBS for 1 h at room temperature and then incubated overnight at room temperature with either anti-GAD65/67 (1:300) or anti-gephyrin (1:100). After several washes, GAD65/67 and gephyrin proteins were detected using biotinylated goat anti-rabbit and streptavidine Alexa 488 (Molecular Probes; catalog No. S32355; used at 1:400 dilution). Sections were counterstained for 10 min with 0.1% DAPI (Sigma, St. Louis, MO). For anti-NMDA-NR2B, immunohistochemistry was performed as previously described⁵⁴. Briefly, brain tissue sections were blocked and permeabilized with 0.2% gelatin, 0.25% Triton X100 diluted in PBS for 1 h at room temperature and then incubated overnight at room temperature with anti-NMDA-NR2B antibody (1:300). After several washes, sections were incubated for 1 h with anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 488. Sections were counterstained for 10 min with DAPI (Sigma-Aldrich, used at 1:3000) before mounting.

Quantification of NR2B and gephyrin puncta labeling. Sections stained with anti-NR2B-NMDA and anti-gephyrin antibodies were imaged at full resolution (voxel size: 0.063 × 0.063 × 0.3 µm) using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 63×/1.4 oil-immersion objective. Images were then processed with AutoQuant X3.1 software (<https://www.mediacy.com/autoquantx3>) and the density of NR2B or gephyrin labeled puncta was quantified using a homemade ImageJ macro (Zsolt Csaba, Inserm UMR1141). After stacking all images, a median filter was applied, a threshold on the fluorescence intensity was then set to select NR2B-NMDA or gephyrin puncta. Puncta were identified as accumulation of more than two pixels (0.126 µm) in diameter, which lead to an average punctum size of 0.34 µm. The density of NR2B-NMDA or gephyrin puncta were calculated by dividing the number of labeled puncta detected in the tectal neuropil by the surface area of this region.

Quantification of Fosab- and GAD65/67-positive neuron density. Sections hybridized with anti-Fosab and anti-GAD65/67 antibodies were imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 40×/1.3 oil-immersion objective. The neurons expressing Fosab or GAD65/67 were manually counted with ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>) on sections of optic tectum or telencephalon. The number of positive neurons was then divided by the surface area of the corresponding regions to calculate a density of neurons expressing those proteins in larvae exposed to DFP or vehicle.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.4.3.686 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Data were first challenged for normality using the Shapiro–Wilk test. Data with a normal distribution were analyzed by a two-tailed unpaired *t*-test. Data not showing normal distribution were analyzed using a two-tailed Mann–Whitney test. All graphs show mean ± s.e.m.

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 5 March 2020; Accepted: 19 October 2020

Published online: 05 November 2020

References

- Mew, E. J. et al. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006–15: systematic review. *J. Affect. Disord.* **219**, 93–104 (2017).
- Konickx, L. A. et al. Reactivation of plasma butyrylcholinesterase by pralidoxime chloride in patients poisoned by WHO class II toxicity organophosphorus insecticides. *Toxicol. Sci.* <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft217> (2013).
- Pereira, E. F. R. et al. Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **350**, 313–321 (2014).
- Jett, D. A. Neurological aspects of chemical terrorism. *Ann. Neurol.* **61**, 9–13 (2007).
- Lotti, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (ed. Krieger, R.) 1543–1589 (Elsevier, Amsterdam, 2010). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00072-0>.
- Todorovic, M. S., Cowan, M. L., Balint, C. A., Sun, C. & Kapur, J. Characterization of status epilepticus induced by two organophosphates in rats. *Epilepsy Res.* **101**, 268–276 (2012).
- Chen, Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology* **33**, 391–400 (2012).
- Collombet, J.-M. Nerve agent intoxication: recent neuropathophysiological findings and subsequent impact on medical management prospects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.07.003> (2011).
- Li, Y. et al. Spatiotemporal pattern of neuronal injury induced by DFP in rats: a model for delayed neuronal cell death following acute OP intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **253**, 261–269 (2011).
- McDonough, J. H. & Shih, T. M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 559–579 (1997).
- Yamasue, H. et al. Human brain structural change related to acute single exposure to sarin. *Ann. Neurol.* **61**, 37–46 (2007).
- Yanicostas, C., Ernest, S., Dayraud, C., Petit, C. & Soussi-Yanicostas, N. Essential requirement for zebrafish anosmin-1a in the migration of the posterior lateral line primordium. *Dev. Biol.* **320**, 469–479 (2008).

13. Martin, E. *et al.* Spatacsin and spastizin act in the same pathway required for proper spinal motor neuron axon outgrowth in zebrafish. *Neurobiol. Dis.* **48**, 299–308 (2012).
14. Brenet, A., Hassan-Abdi, R., Somkhit, J., Yanicostas, C. & Soussi-Yanicostas, N. Defective excitatory/inhibitory synaptic balance and increased neuron apoptosis in a zebrafish model of dravet syndrome. *Cells* **8**, 1199 (2019).
15. Ghomid, J. *et al.* ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2652–2661 (2013).
16. Yanicostas, C. *et al.* Requirement for Zebrafish ataxin-7 in differentiation of photoreceptors and cerebellar neurons. *PLoS ONE* **7**, e50705 (2012).
17. MacRae, C. A. & Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 721–731 (2015).
18. Lessman, C. A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **93**, 268–280 (2011).
19. Delvecchio, C., Tiefenbach, J. & Krause, H. M. The Zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 354–361 (2011).
20. Rinkwitz, S., Mourrain, P. & Becker, T. S. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog. Neurobiol.* **93**, 231–243 (2011).
21. Ito, H. & Yamamoto, N. Non-laminar cerebral cortex in teleost fishes?. *Biol. Lett.* **5**, 117–121 (2009).
22. Wullimann, M. F. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. *Integr. Zool.* **4**, 123–133 (2009).
23. Flannery, B. M. *et al.* Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–16 (2016).
24. Dragunow, M., Yamada, N., Bilkey, D. K. & Lawlor, P. Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures. *Mol. Brain Res.* **13**, 119–126 (1992).
25. Lösing, P. *et al.* SRF modulates seizure occurrence, activity induced gene transcription and hippocampal circuit reorganization in the mouse pilocarpine epilepsy model. *Mol. Brain* **10**, 1–22 (2017).
26. Szyndler, J. *et al.* Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. *Epilepsy Behav.* **16**, 216–224 (2009).
27. Liu, J. & Baraban, S. C. Network properties revealed during multi-scale calcium imaging of seizure activity in zebrafish. *eNeuro* **6**, ENEURO.0041-19.2019 (2019).
28. Verrotti, A., Milioni, M. & Zaccara, G. Safety and efficacy of diazepam autoinjector for the management of epilepsy. *Exp. Rev. Neurother.* **15**, 127–133 (2014).
29. Petras, J. M. Neurology and neuropathology of soman-induced brain injury: an overview. *J. Exp. Anal. Behav.* **61**, 319–329 (1994).
30. Shih, T.-M., Duniho, S. M. & McDonough, J. H. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00019-X) (2003).
31. Kim, Y. B. *et al.* Organophosphate-induced brain injuries: delayed apoptosis mediated by nitric oxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **7**, 147–152 (1999).
32. Kaur, P., Radotra, B., Minz, R. W. & Gill, K. D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology* **28**, 1208–1219 (2007).
33. Gunay, N. *et al.* Protective effects of Y-27632 on acute dichlorvos poisoning in rats. *Am. J. Emerg. Med.* **28**, 268–274 (2010).
34. Lallement, G. *et al.* Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study. *Neurotoxicology* **12**, 655–664 (1991).
35. Lallement, G. *et al.* Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: comparison with the hippocampus. *C. R. Acad. Sci. III* **313**, 421–426 (1991).
36. Lallement, G. *et al.* Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Res.* **563**, 234–240 (1991).
37. Dawson, A. H. *et al.* Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med.* **7**, e1000357 (2010).
38. Bertolote, J. M., Fleischmann, A., Eddleston, M. & Gunnell, D. Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br. J. Psychiatry* **189**, 201–203 (2006).
39. Saunders, B. *Some Aspects of the Chemistry and Toxic Action of Organic Compounds Containing Phosphorus and Fluorine* (Cambridge University Press Wiley, New York, 1957).
40. McCarren, H. S. & McDonough, J. H. Anticonvulsant discovery through animal models of status epilepticus induced by organophosphorus nerve agents and pesticides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1374**, 144–150 (2016).
41. Dragunow, M. & Robertson, H. A. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* **329**, 441–442 (1987).
42. Le Gal, G. & Salle, L. Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci. Lett.* **88**, 127–130 (1988).
43. Simler, S. *et al.* C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* **175**, 58–62 (1994).
44. Diaz Verdugo, C. *et al.* Glia-neuron interactions underlie state transitions to generalized seizures. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
45. Trinka, E. *et al.* A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* **56**, 1515–1523 (2015).
46. Shih, T. M. & McDonough, J. H. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J. Appl. Toxicol.* **17**, 255–264 (1997).
47. Tryphonas, L. & Clement, J. G. Histomorphogenesis of soman-induced encephalocardiomyopathy in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* **23**, 393–409 (1995).
48. Henshall, D. C., Chen, J. & Simon, R. P. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *J. Neurochem.* **74**, 1215–1223 (2000).
49. Narkilahti, S., Pirttila, T. J., Lukasiuk, K., Tuunanen, J. & Pitkanen, A. Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1486–1496 (2003).
50. Kaur, S., Singh, S., Chahal, K. S. & Prakash, A. Potential pharmacological strategies for the improved treatment of organophosphate-induced neurotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 893–911 (2014).
51. Solberg, Y. & Belkin, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 183–185 (1997).
52. Akerboom, J. *et al.* Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012> (2012).
53. Chatterjee, D., Tran, S., Shams, S. & Gerlai, R. A simple method for immunohistochemical staining of zebrafish brain sections for c-fos protein expression. *Zebrafish* **12**, 414–420 (2015).
54. Puverel, S., Nakatani, H., Parras, C. & Soussi-Yanicostas, N. Prokineticin receptor 2 expression identifies migrating neuroblasts and their subventricular zone transient-amplifying progenitors in adult mice. *J. Comp. Neurol.* **512**, 232–242 (2009).

Author contributions

A.B. and J.S. performed the experiments, the analysis, and designed the figures. R.H.A., A.I., D.S., C.R., O.B. and N.T. helped carry out the experiments. N.D. helped supervise the project. C.Y., G.D.B., F.N. and N.D. contributed to the final manuscript. N.S.Y. supervised the project and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76056-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.S.-Y.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

CHAPITRE IV :
Discussion

Épilepsies et Microglies

Les épilepsies constituent l'une des maladies neurologiques les plus fréquentes dans le monde. Il s'agit d'un trouble caractérisé par une hyperactivité synchrone, spontanée et récurrente, de populations de neurones plus ou moins étendues, dans le cerveau. Parce qu'il s'agit d'une altération du fonctionnement des neurones, les recherches scientifiques et cliniques ont concentré leur attention sur la compréhension du fonctionnement de ces cellules. De ce fait, les traitements qui ont alors été découverts sont entièrement focalisés sur l'utilisation de molécules permettant de diminuer directement l'activité des neurones, dans le but de diminuer la fréquence et l'intensité des crises. Cependant, même si ces traitements permettent un contrôle plus ou moins efficace des crises dans 70% des cas, un tiers des patients, notamment dans les épilepsies pédiatriques, ne répondent pas à ces molécules, les laissant ainsi sans véritable traitement. C'est pourquoi, la découverte de nouvelles voies thérapeutiques est essentielle. Pour y arriver, il est nécessaire d'étudier les mécanismes biologiques menant à l'apparition des crises au niveau du cerveau dans son ensemble et des différentes cellules, neuronales et gliales, qui le composent.

Le déséquilibre de la balance synaptique excitation/inhibition et défaut des systèmes inhibiteurs

Le fonctionnement homéostatique du cerveau est basé sur un équilibre entre les systèmes excitateurs et les systèmes inhibiteurs. Il apparaît que des défauts des circuits GABAergiques ainsi qu'un déséquilibre de la balance des synapses excitatrices/inhibitrices pourrait causer une hyperexcitabilité neuronale (Bonansco and Fuenzalida 2016; Khazipov et al. 2015; Liu et al. 2020; McNamara et al. 2006). Une partie de ma thèse a été consacrée à l'analyse des synapses excitatrices et inhibitrices dans un modèle génétique d'épilepsie chez l'embryon de poisson (*scn1Lab-KD*), ainsi qu'un modèle d'empoisonnement à un organophosphoré entraînant des crises épileptiformes chez l'embryon de poisson zèbre. L'étude des systèmes inhibiteurs *via* la lignée transgénique Tg[Gad1b:GFP], pour les embryons *scn1Lab-KD*, ou par l'immunomarquage des protéines GAD65/67, pour les embryons traités au DFP, montre une réduction de la population des neurones GABAergiques dans ces deux modèles (Brenet et al. 2019, 2020). L'immunodétection des protéines PSD95 et géphyrine, marquant respectivement les synapses excitatrices et inhibitrices, montre une augmentation de la densité des *puncta* PSD95 et une diminution des *puncta* géphyrine dans le cerveau des

embryons *scn1Lab*-KD et dans les embryons exposés au DFP, indiquant clairement un déséquilibre en faveur de l'excitation (Brenet et al. 2019, 2020). Ces résultats montrent que nos deux modèles présentent des défauts majeurs de la balance excitation/inhibition (E/I) dans le cerveau, confirmant l'importance de cet équilibre dans l'épileptogénèse. D'autres études ont analysé la population des neurones GABAergiques dans le cerveau de mutants *scn1Lab*. Une première étude, réalisée sur le mutant *Didy*^{S552}, n'avait pas montré de défaut du nombre d'interneurones GABAergique dans ces embryons âgé de 5 jpf (Grone et al. 2017). Au contraire, une étude récente, dans un autre mutant *scn1Lab*^{-/-}, confirme une perte des neurones GABAergiques dans ces embryons mais à un âge plus avancé (7 jpf) sans observer de différences à 4 jpf, soit au même stade que notre étude (Tiraboschi et al. 2020). Ces différences peuvent s'expliquer par les différentes techniques utilisées pour inhiber le gène *scn1Lab*, ainsi que par des différences du fond génétique des embryons ou encore par les techniques utilisées pour la quantification des neurones GABAergiques. Nos observations constituent néanmoins une constatation cohérente parmi tous les modèles d'épilepsie acquise, y compris l'état de mal épileptique et les lésions cérébrales traumatiques, fréquemment observés dans l'épilepsie du lobe temporelle (de Lanerolle et al. 1989; Swartz et al. 2006). De même, de nombreuses études montrent que des anomalies du ratio des synapses excitatrices et inhibitrices peuvent être au cœur de nombreux troubles neurologiques (Stephan et al. 2012), et notamment dans les épilepsies (Andoh et al. 2019). Notre modèle d'empoisonnement au DFP met ici en lumière la vitesse à laquelle ce déséquilibre synaptique peut s'opérer. Néanmoins la question serait de savoir si ce défaut est à l'origine des crises ou s'il n'en est qu'une conséquence. Même si le concept des défauts de l'équilibre E/I a permis des avancées importantes dans la compréhension des bases physiologique et cellulaire de l'épileptogénèse, mais aussi dans la compréhension du mode d'action des médicaments anticonvulsifs « classique », ce concept est tout de même remis en question. Notamment, après la découverte de certains types crises se produisant alors que l'inhibition est renforcée. Par exemple, les courants inhibiteurs GABA_A sont accrus dans les neurones thalamocorticaux lors des absences épileptiques (Cope et al. 2009). De plus, certaines mutations génétiques entraînant des épilepsies, telles que les mutations dans les gènes codant la protéine de liaison à la syntaxine 1 (*STXBP1*) ou la protocadhérine 19 (*PCDH19*), ne semblent pas induire de déséquilibre de la balance synaptique (Shao et al. 2019). Ainsi, l'implication de la balance E/I pourrait dépendre du type d'épilepsie étudié. De plus, on pourrait penser que les patients

présentant un déséquilibre permanent de la balance E/I auraient des crises en permanence et non par intermittence. Ainsi, il est supposé que le balance E/I ne serait pas statique mais qu'elle évoluerait en fonction des conditions cérébrales et, notamment, en fonction de la neuro-inflammation. Il serait alors intéressant d'utiliser les deux modèles que nous avons décrit combinés avec des lignées transgéniques marquant les synapses excitatrices et inhibitrices (Du et al. 2018; Jontes and Emond 2012) afin de suivre leur réarrangement en temps réel dans un cerveau en proie à une hyperexcitabilité neuronale.

La mort neuronale dans les épilepsies

Les crises d'épilepsie sont caractérisées par une hyperexcitabilité neuronale associée à une augmentation des systèmes excitateurs dans le cerveau dont le principal neurotransmetteur est le glutamate. Ainsi, les crises récurrentes provoquent une augmentation de la concentration extracellulaire du glutamate pouvant conduire à une dérégulation de l'homéostasie des ions Ca^{2+} , à la production de radicaux libres, à un stress oxydatif, à un dysfonctionnement mitochondrial et, finalement, à la mort cellulaire (Barker-Haliski and Steve White 2015). Une partie de mon travail de thèse a été d'étudier la mort cellulaire cérébrale dans les embryons *scn1Lab*-KD et les embryons exposés au DFP. Les marquages *in vivo* de ces embryons à l'acridine orange, ainsi que l'immunodétection de la forme activée de la protéine Caspase-3, ont montré une augmentation significative de la mort cellulaire dans le cerveau des embryons issus de nos deux modèles, confirmant le potentiel excitotoxique des crises (Brenet et al. 2019, 2020). Néanmoins, même s'il a déjà été montré qu'un empoisonnement aux organophosphorés conduit à des lésions cérébrales (Enderlin et al. 2020; Kim et al. 1999), il en est autrement pour le syndrome de Dravet. En effet, même si de nombreuses études ont montré que des crises répétées peuvent induire une augmentation de la mort cellulaire dans le cerveau (Benz et al. 2014; Henshall and Murphy 2008; Kotloski et al. 2002; Li et al. 2018), il semblerait que le syndrome de Dravet fasse exception. Des études post-mortem de patients Dravet n'ont pas montré d'augmentation de la mort cellulaire dans le cerveau (Hata et al. 2020). De même, la caractérisation des conséquences de la perte de fonction de gène *Scn1a* chez la souris n'indique pas la présence d'une surmortalité des cellules cérébrales (Salgueiro-Pereira et al. 2019). Ainsi, nos observations faites sur les embryons *scn1Lab*-KD seraient contraires aux résultats obtenus dans d'autres modèles animaux et dans les études post-mortem chez l'Homme. Une explication viendrait de la différence des stades

auxquels ces observations ont été faites. En effet, notre étude se concentre sur les stades très précoces, le cerveau d'un embryon de poisson zèbre âgé de 4 jpf est globalement au même stade du développement qu'un nourrisson nouveau-né. Au contraire, les études réalisées chez la souris et chez l'Homme correspondent à des stades plus avancés de la maladie. Ainsi, la mort cellulaire que nous avons observée résulterait directement de la perte de fonction du gène *scn1Lab* et constituerait un mécanisme de l'épileptogenèse dans le syndrome de Dravet. Enfin, il ne faut pas oublier que les embryons *scn1Lab*-KD restent des modèles du syndrome de Dravet. Ainsi il n'est pas forcément surprenant que, même si le gène *scn1Lab* est l'orthologue du gène *SCN1A*, la perte de fonction de ces deux gènes dans des espèces plus ou moins éloignées présente des différences.

Activation microgliale, neuro-inflammation et crises d'épilepsie

Le neuro-inflammation a été impliquée dans les épilepsies depuis plus de 15 ans. En effet de nombreuses études ont montré qu'une hyperexcitabilité neuronale peut provoquer l'activation des cellules gliales, principalement les microglies et les astrocytes, lesquelles déclenchent une réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 ou le TNF α . En effet, de nombreuses observations, réalisées à partir de tissus cérébraux de patients épileptiques et de modèles animaux, montrent que l'hyperexcitabilité neuronale entraîne une neuro-inflammation majeure (Crespel et al. 2002; Dupuis and Auvin 2015; Peltola et al. 2002; Vezzani et al. 2013; de Vries et al. 2016). Cet état inflammatoire chronique peut alors perturber le fonctionnement des neurones, créant ainsi un cercle vicieux propice à l'hyperexcitabilité neuronale (Auvin et al. 2007, 2010). La partie principale de mon travail de thèse a été d'étudier le comportement des cellules microgliales et de quantifier leur réponse inflammatoire dans le modèle *scn1Lab*. L'observation *in vivo* des cellules microgliales dans le cerveau des embryons *scn1Lab*-KD a montré que les cellules microgliales adoptent une morphologie légèrement plus amiboïde et deviennent plus mobiles (**Article 2, Figure 1 et Article 2, Figure 2**). L'étude comparative de la morphologie des cellules microgliales entre les embryons contrôles et les embryons *scn1Lab*-KD montre une augmentation du pourcentage de microglie « amiboïdes » contre une diminution du pourcentage de microglie « ramifiées » (**Article 2, Figure 1**). Aucune inflammation généralisée n'est détectée dans le cerveau des larves *scn1Lab*-KD à ce stade, même si une analyse par RT-qPCR montre une légère surexpression, non significative, des cytokines pro-inflammatoires, il-

1 β et il-8 (Article 2, Figure 3). En revanche, l'imagerie directe de l'expression du gène *il-1 β* , grâce à la lignée transgénique Tg[il-1 β :GFP], a permis de montrer une surexpression significative de l'*il-1 β* par les cellules microgliales dans le modèle Dravet dans les embryons *scn1Lab*-KD (Article 2, Figure 3). Ces résultats montrent que le modèle génétique *scn1lab* induit une activation partielle des cellules microgliales dès les stades précoces de la maladie, provoquant par la même occasion l'initiation d'une neuro-inflammation significative, mais probablement trop faible pour être détectée dans des extraits de cerveau ou d'embryons entiers, soulignant la différence marquante entre l'utilisation de modèle génétique d'épilepsie, comme *scn1Lab*, et les modèles pharmacologiques, comme le modèle DFP. Des travaux en cours dans l'équipe montrent une neuro-inflammation accrue dans le modèle DFP (le gène *il-1 β* , est surexprimé 400 fois dans le modèle DFP, (Somkhit et al., en préparation). Il serait intéressant de suivre l'évolution de ces processus à des stades plus avancés chez les larves *scn1Lab*-KD. Il est important de noter que les études de l'activation microgliale et de la neuro-inflammation dans les modèles de perte de fonction du gène *Scn1a* chez les rongeurs sont très variables. En effet, certains travaux montrent une activation importante des cellules microgliales dans le cortex pré-frontal et le gyrus denté ainsi qu'une expression accrue des gènes *il-1 β* et *Tnfa* (Satta et al. 2021), alors que d'autres études ne montrent aucune activation microgliale dans l'hippocampe et une absence totale de neuro-inflammation (Salgueiro-Pereira et al. 2019). Toutefois, ces résultats proviennent de souris de souches différentes, portant des mutations différentes du gène *Scn1a*, et l'étude de la neuro-inflammation a été réalisée à des stades différents, ce qui peut expliquer les différences de résultats. Chez l'humain, une étude réalisée à partir de cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC) de patients Dravet, a observé que les monocytes de ces patients présentent une réponse inflammatoire plus importante que ceux des échantillons contrôles, après une stimulation immunitaire par un vaccin (Auvin et al. 2018). Cette étude indique qu'une inflammation périphérique pourrait contribuer l'hyperexcitation du cerveau.

Nos résultats permettent aussi de penser que les processus neuro-inflammatoires dans les épilepsies pourraient être plus réduits que ceux décrits dans la littérature. En effet, même si l'utilisation de molécules pro-convulsivantes dans l'induction des crises épileptiformes dans les modèles rongeurs, a permis de collecter de nombreuses informations sur les liens qui existent entre les crises et la neuro-inflammation (Vezzani et al. 2013), on ne peut pas exclure que la neuro-inflammation observée, dans ces modèles, soit due à une réaction directe des

cellules gliales aux molécules pro-convulsivantes. De même, on ne peut pas exclure que ces molécules soient trop « puissantes » et entraînent très rapidement des crises très intenses, ce qui est en opposition avec la dynamique observée chez les humains. En effet, par leur action quasi-immédiate, ces molécules provoquent une modification accélérée du fonctionnement du cerveau, d'une condition physiologique à une condition hyperexcitée, sans laisser le temps aux mécanismes biologiques de s'adapter. Les conclusions issues de ces modèles sont alors certainement à relativiser, notamment, vis-à-vis des épilepsies d'origines génétiques. Ainsi, les mutations associées aux différentes formes d'épilepsie constituent peut-être un moyen plus physiologique pour induire des crises d'épilepsie dans les modèles animaux, puis étudier la relation entre les crises et la neuro-inflammation. Cependant, même si les modèles génétiques permettent de mieux reproduire la pathologie humaine, les observations réalisées sont toujours spécifiques de la mutation étudiée, comme le montre les résultats très variables obtenus chez les rongeurs. Dans notre laboratoire, la comparaison de la neuro-inflammation dans des modèles génétiques (Brenet et al. en préparation) et pharmacologiques d'épilepsie (Somkhit, en préparation), montre une différence importante de la neuro-inflammation dans les deux modèles et nous incite à interpréter avec beaucoup de prudence les résultats émanant de modèles pharmacologiques d'épilepsie. C'est pourquoi, de par l'expérience acquise dans l'équipe, il nous semble préférable de travailler avec des modèles génétiques d'épilepsie. Ceci explique que l'équipe a investi dans la caractérisation de plusieurs mutants génétiques d'épilepsie (*gabra1*^{-/-}, *gabrg2*^{-/-}, *depcd5*^{-/-}, *scn1lab*^{-/-}) (Scott C. Baraban, Dinday, and Hortopan 2013; Liao et al. 2019; Samarut et al. 2018; Swaminathan et al. 2018), qui sont maintenant en cours d'étude dans l'équipe. Nous pensons que ces modèles génétiques d'épilepsie reflètent mieux la physiopathologie de la maladie telle qu'elle se manifeste chez les patients.

Enfin, même si les chercheurs s'accordent à dire que la neuro-inflammation associée à l'activation des cellules gliales est un marqueur général des épilepsies (Vezzani et al. 2008), des études récentes montrent que des changements phénotypiques non-inflammatoires de la microglie suffisent à provoquer des crises (Zhao et al. 2018). D'autres études soulignent, quant à elles, la grande variabilité des processus inflammatoires qui existent dans les différentes épilepsies humaines et les différents modèles animaux (Gasmi et al. 2021). Ces observations remettent en cause les conclusions d'un impact central de la neuro-inflammation dans toutes les épilepsies. De plus, la neuro-inflammation observée dans les

tissus de résection des foyers épileptiques pourrait être surestimée par l'impact de l'opération chirurgicale en elle-même. De même, les conditions de conservation des échantillons et le temps passé entre les prélèvements et les analyses, pourraient aussi entraîner des inflammations non-physiologiques. En effet, on sait que les cellules microgliales sont capables de modifier très rapidement leur phénotype en fonction des modifications de leur environnement. De plus, des études du transcriptome des cellules microgliales montrent que ces dernières adoptent un profil inflammatoire dès leur mise en culture (Gosselin et al. 2017). Ainsi il est important de mettre au point des techniques non-invasives, comme nous le proposons, pour étudier le comportement *in vivo* des cellules gliales et la neuro-inflammation.

Implication des cellules microgliales dans les crises épileptiformes

Les cellules microgliales peuvent jouer un rôle important dans l'épileptogénèse et les épilepsies (**Figure 14**) (Hiragi et al. 2018). Cependant, alors que certaines études soutiennent que la microglie serait néfaste dans un contexte épileptique, principalement à cause de son activation et de la sécrétion chronique de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi par une dérégulation des mécanismes d'élimination des synapses (Andoh et al. 2019; Rana and Musto 2018). D'autres études suggèrent, en revanche, que la microglie jouerait un rôle bénéfique, en diminuant l'excitabilité neuronale et en modulant la plasticité synaptique (Badimon et al. 2020; Eyo et al. 2014; Li et al. 2012). Une partie de mon travail de thèse fut alors d'étudier l'impact des cellules microgliales dans le modèle *scn1Lab*. Pour ce faire, nous avons réalisé l'ablation génétique des cellules microgliales dans les embryons *scn1Lab*-KD et montré que même en absence de ces cellules, la perte de fonction du gène *scn1Lab* conduit toujours à l'apparition de crises épileptiformes chez les embryons. Ces observations suggèrent que les mécanismes de l'épileptogénèse sont indépendants des cellules microgliales dans les embryons *scn1Lab*-KD. De plus, il apparaît que l'absence des cellules microgliales provoque une augmentation de l'intensité des crises. Néanmoins, il est difficile de conclure quant au rôle de la microglie sur ces crises, car les différences observées peuvent être une conséquence directe de l'absence des microglies mais aussi une conséquence indirecte de leur absence lors du développement. Il serait alors intéressant d'étudier l'implication des cellules microgliales dans la modulation de l'activité neuronale à des stades plus tardifs et avec des méthodes autres que l'ablation génétique, afin de séparer plus facilement les conséquences développementales des conséquences directes de l'absence des cellules microgliales. Ces

études à différents stades de la maladie, pourraient permettre de clarifier le rôle des cellules microgliales dans les épilepsies. En effet, plusieurs travaux suggèrent que les cellules microgliales seraient initialement bénéfiques dans les épilepsies en réduisant l'hyperexcitabilité des neurones (Vinet et al. 2012). Les microglies seraient ensuite "submergées" par les crises répétées, lesquelles provoqueraient une saturation des signaux purinergiques et entraîneraient une altération de la capacité des microglies à détecter les neurones hyperexcités *via* les microgradients d'ATP. De plus, les crises récurrentes pourraient aussi provoquer une activation des cellules microgliales entraînant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Vezzani et al. 2008). Cet état inflammatoire chronique serait alors néfaste pour les neurones (Terrone et al. 2020), mais aussi pour les synapses (Andoh et al. 2019).

La modulation de l'activité microgliale

La modulation de l'activité des cellules microgliales pourrait offrir de nouvelles opportunités pour le traitement des épilepsies réfractaires. En effet, l'identification de molécules permettant de moduler l'activation des cellules microgliales pour diminuer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et maintenir ces cellules dans un état homéostatique potentiellement plus bénéfique, est un véritable défi. Récemment, Rahma Hassan-Abdi, une ancienne étudiante de notre équipe, a développé un modèle de neuro-inflammation chez l'embryon de poisson zèbre avec lequel elle a montré qu'il est possible de moduler l'activité de la microglie en utilisant la carbétocine, un agoniste du récepteur de l'ocytocine (Mairesse et al. 2019). Ce travail avait montré que le traitement à la carbétocine permet de réduire la production de cytokines pro-inflammatoires et de restaurer la morphologie, ainsi que la dynamique des cellules microgliales, sur des microglies de souris en culture mais aussi *in vivo* chez le poisson. Ce travail apporte la preuve du concept de la possibilité de moduler *in vivo* l'activité microgliale (Mairesse et al. 2019). Des travaux plus poussés, réalisés chez la souris dans l'équipe d'Olivier Baud, ont montré que cette neuro-protection par la carbétocine a pour conséquence une amélioration significative des dommages de la substance blanche et des fonctions cognitives (mémoire, augmentation de la connectivité neuronale) (Mairesse et al. 2019). Comme notre modèle *scn1Lab* du syndrome de Dravet montre une modification de la morphologie et de la dynamique des cellules microgliales, associée à une surexpression du gène *il-1 β* (Article 2, Figure 3), nous avons voulu déterminer si la carbétocine pouvait empêcher ou réduire, cette activation des cellules

microgliales et avoir un effet sur les crises épileptiformes. Nous avons observé que le traitement avec la carbétocine empêche l'activation des cellules microgliales qui restent dans un état homéostatique. D'une manière intéressante, le suivi, en parallèle, de l'activité neuronale a permis de montrer que le traitement avec la carbétocine permet aussi de réduire significativement la fréquence des crises ainsi que les troubles moteurs et la mort cellulaire cérébrale associée (**Figure 20**). Un travail en cours dans l'équipe vérifie actuellement si l'action de la carbétocine résulte bien de l'activation des récepteurs ocytocinergiques. Nous avons ensuite cherché à déterminer le mécanisme par lequel la carbétocine réduit la fréquence des crises. Plusieurs mécanismes sont envisageables : (1) l'effet pourrait être dû à une modulation de l'activation des cellules microgliales conduisant à une diminution de la neuro-inflammation ; (2) la carbétocine pourrait aussi moduler l'épileptogenèse empêchant ainsi l'apparition des crises ; (3) enfin, elle pourrait agir directement sur l'excitabilité des neurones. Le mécanisme d'action de la carbétocine reste, pour le moment, inconnu, même si les deux premières hypothèses semblent les plus probables. De plus, notre étude a été réalisée durant la phase d'initiation des crises et nous ne savons pas si la carbétocine peut être efficace face à des crises chroniques durant la phase aiguë de la maladie. Néanmoins, il est permis de penser que les effets anti-inflammatoires de la carbétocine, démontrés dans le travail de Mairesse et collaborateurs (Mairesse et al. 2019) , permettraient de réduire la fréquence des crises. En effet, de nombreuses études montrent que plusieurs molécules anti-inflammatoires ont des effets antiépileptiques dans des modèles animaux d'épilepsie et constituent ainsi une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des épilepsies humaines réfractaires (Kwon et al. 2013; Radu et al. 2017; Vezzani, Balosso, and Ravizza 2019).

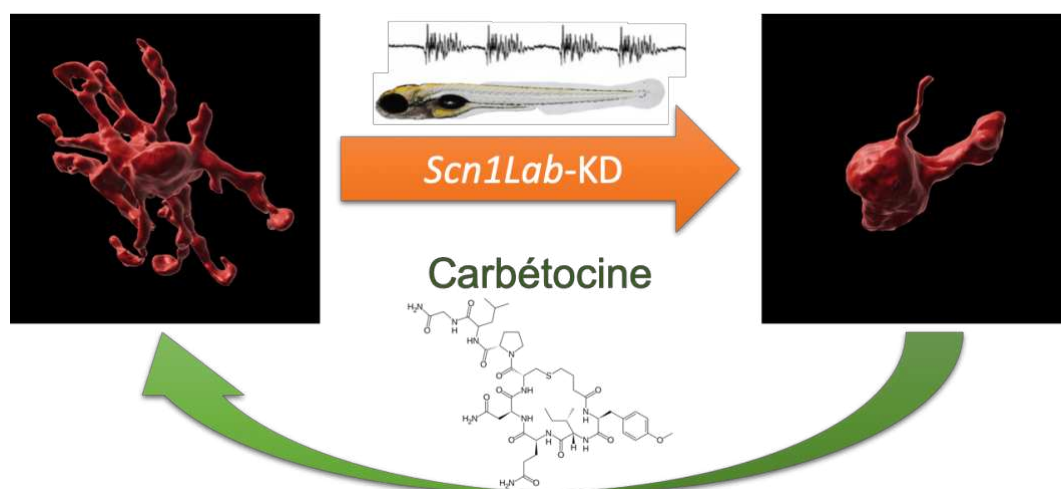


Figure 20 : Modulation de l'activation des cellules microgliales par la carbétocine et conséquences sur l'hyperexcitabilité neuronale dans les embryons scn1Lab-KD.

Les apports du poisson zèbre

L'imagerie calcique

L'enregistrement de l'activité électrique des neurones, *via* un réseau d'électrodes, constitue la technique standard pour étudier l'activité cérébrale d'un organisme vivant, et notamment chez l'Humain, où elle représente un moyen de diagnostic irremplaçable des épilepsies. Néanmoins, cette technique n'est pas toujours adaptée pour les modèles animaux et elle nécessite souvent de la chirurgie pour le placement des électrodes, ce qui peut provoquer une neuro-inflammation localisée, fragilisant les neurones et potentiellement exacerbant les crises. C'est pourquoi, les scientifiques ont cherché un autre moyen, non-invasif, permettant de suivre l'activité des neurones. D'où l'idée que la visualisation de la variation de la concentration intraneuronale des ions calciques qui sont un messager essentiel du système nerveux central, responsable de l'excitabilité des neurones et de la transmission synaptique, pourrait être une alternative d'un grand intérêt. Ainsi, les chercheurs ont développé des bio-senseurs *in vivo* des ions calciques. Néanmoins, la corrélation entre les enregistrements électriques et celui des influx de calcium dans les neurones n'est pas simple en raison des différences d'échelles temporelle et spatiale entre les deux techniques. En effet, il est nécessaire d'avoir à la fois une fréquence d'imagerie suffisante pour détecter des variations significatives de l'intensité de fluorescence de la sonde calcique, mais aussi d'enregistrer l'activité électrique des neurones dans la fenêtre d'enregistrement des variations du calcium. En appliquant ces conditions et en optimisant les paramètres d'enregistrement, nous avons pu, pour la première fois dans un modèle génétique d'épilepsie, montrer la corrélation parfaite existant entre l'activité électrique des neurones et les variations de la concentration intraneuronale des ions calciques (**Figure 21**).

Ainsi, l'embryon de poisson zèbre, grâce à la petite taille de son cerveau, à sa transparence et aux nouvelles techniques d'imagerie, comme la microscopie en champ lumineux (*light-sheet microscopy*), constitue un modèle animal idéal pour le suivi en temps réel de l'activité calcique des neurones (Ahrens et al. 2013). En effet, ces enregistrements peuvent permettre de cartographier l'activité individuelle de chaque neurone au niveau de l'ensemble du cerveau. De telles analyses, appliquées aux différents modèles génétiques et pharmacologiques d'épilepsie, offrent une vision, spatiale et temporelle, inédite de l'initiation et de la propagation des crises. Ces enregistrements offrent aussi la possibilité de corréler les

zones du cerveau touchées par les crises et les phénotypes, notamment les phénotypes moteurs, observés chez les larves.

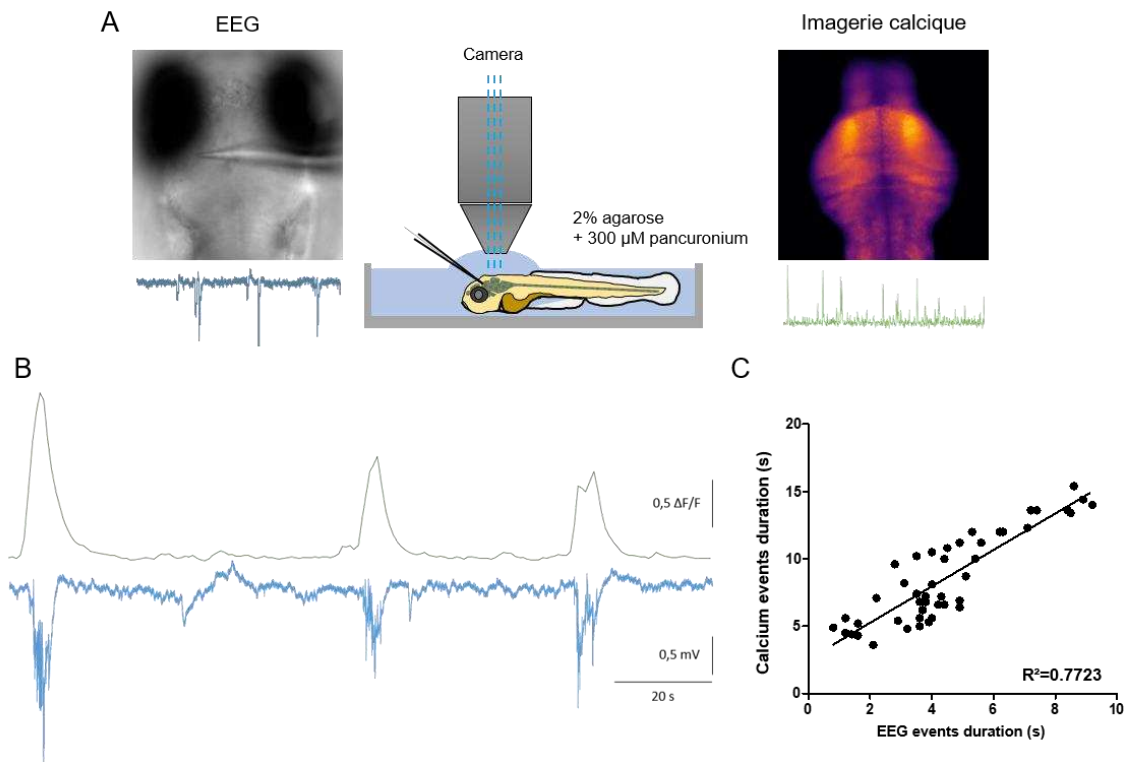


Figure 21 : Corrélation entre l'activité électrique des neurones et les variations de la concentration intraneuronale des ions calciques. (A) Schéma de l'enregistrement simultané de l'activité électrique et calcique des neurones des embryons *scn1Lab-KD*. (B) Enregistrements représentatifs de l'activité électrique et de la variation de fluorescence de la sonde calcique dans le tectum optique des larves *scn1Lab-KD* âgées de 4 jpf. (C) Corrélation les événements électriques et calciques.

Néanmoins, même si l'imagerie calcique représente une méthode alternative intéressante pour l'enregistrement de l'activité neuronale, elle se heurte tout de même à plusieurs limitations. Tout d'abord, même si l'imagerie calcique offre une résolution spatiale largement supérieure à celle des enregistrements « classiques » de l'activité électrique, sa résolution temporelle reste, quant à elle, bien inférieure à celle de l'EEG. En effet, l'imagerie calcique est limitée, à la fois par la vitesse maximale d'imagerie, mais aussi par la cinétique de fonctionnement des bio-senseurs des ions calciques utilisés (Lin and Schnitzer 2016). De plus, il est nécessaire de prendre en considération les possibles interférences de ces bio-senseurs qui piègent une partie des ions Ca^{2+} libres et peuvent donc interférer avec la physiologie des signaux calciques (McMahon and Jackson 2018; Yang et al. 2018). Enfin, des études temporelles en 3 dimensions de l'activité neuronale restent encore très compliquées. Tout d'abord, ces études en 3D sont limitées par les techniques d'imagerie actuelles qui limitent la vitesse d'acquisition sur l'ensemble du cerveau. D'autre part, sur le

plan analytique, il est difficile de corréler dans le temps et dans l'espace, les millions de signaux représentant l'activité des milliers de neurones individuels analysés. Enfin, conceptuellement, même si les crises d'épilepsie sont associées au changement du comportement des neurones individuellement, ce sont les changements dynamiques à l'échelle mésoscopique qui impliquent des circuits, voire des réseaux entiers, de neurones qui sont la marque caractéristique des crises d'épilepsie. De plus, les conséquences des modifications de l'activité des cellules isolées sur la dynamique des processus à l'échelle mésoscopique restent souvent imprédictibles. Dès lors, à partir de combien de cellules excitées simultanément dans une région donnée du cerveau peut-on dire qu'il s'agit d'une crise d'épilepsie ? A quelle échelle spatiale peut-on regrouper les neurones excités en un foyer épileptique, et à quelle échelle temporelle ? Toutes ces interrogations restent encore sans réponses. Néanmoins, l'imagerie calcique constitue une méthode puissante et intéressante pour l'étude de l'activité neuronale, ouvrant la voie vers de nouvelles approches pour l'étude des crises d'épilepsie, indispensables à leur compréhension.

L'étude *in vivo* de la dynamique des cellules microgliales

Les cellules microgliales sont des cellules versatiles qui modifient leur physiologie et leur morphologie d'une façon très dynamique en réponse à des modifications ou à des stress de leur environnement. Jusqu'à présent, la majorité des études visant à étudier la physiologie des cellules microgliales ont été réalisées par des méthodes *in vitro* ou *ex vivo*. Cependant, même si ces techniques ont évolué pour les adapter à l'étude particulière des cellules microgliales, elles ne permettent pas de reproduire la complexité des conditions physiologiques et encore moins des situations pathologiques. En effet, une étude longitudinale du transcriptome des cellules microgliales après leur mise en culture montre que ces cellules modifient le profil d'expression de leur génome 6 heures seulement après le transfert, conduisant à une inversion complète de leur transcriptome 18 heures plus tard (Gosselin et al. 2017). Ces travaux montrent que la réponse des cellules microgliales dépend énormément de leur environnement et, notamment, des signaux émis par les neurones et par les autres cellules gliales. Cette étude remet en question les résultats obtenus avec les cellules en culture. Il est aussi permis de s'interroger sur les possibles biais dans les études transcriptomiques qui seraient dus aux traitements chimiques et mécaniques indispensables à l'isolation des cellules microgliales puis à l'extraction de leurs ARN. Ces biais expérimentaux

pourraient dissimuler des micro-changements potentiellement cruciaux au fonctionnement des cellules microgliales. Même si ces techniques restent la base pour l'étude du transcriptome des cellules microgliales, il est alors nécessaire de développer des méthodes non-invasives afin d'évaluer fidèlement la dynamique de l'expression du génome des cellules microgliales (Sieger and Peri 2013).

Grâce à la transparence des embryons, ajoutée aux nombreuses lignées transgéniques qui expriment des marqueurs cellulaires fluorescents des cellules microgliales, et aux techniques d'imagerie *in vivo* (imagerie confocale et multi-photonique), ce modèle est idéal pour l'étude en temps réel de la dynamique des cellules microgliales dans le cerveau d'un organisme vivant. Cet animal a notamment permis d'étudier l'activité phagocytaire des cellules microgliales en contexte physiologique et pathologique (Mazaheri et al. 2014). De même, pendant sa thèse, Rahma Hassan-Abdi a étudié la dynamique microgliale dans un modèle de tauopathie chez l'embryon de poisson zèbre et elle a observé un changement de la morphologie et de la dynamique de la microglie en rapport avec l'expression pathologique de la protéine Tau. Elle a aussi filmé de manière élégante la phagocytose des cellules tauopathiques par les cellules microgliales (Hassan-Abdi et al. 2019). Le poisson zèbre a aussi permis d'étudier en temps réel les mécanismes de chimioattraction mis en oeuvre en réponse à une lésion cérébrale (Sieger et al. 2012). De plus, la combinaison d'une lignée transgénique marquant les microglies avec une lignée exprimant un bio-senseur calcique dans les neurones, permet de suivre la dynamique des cellules microgliales en lien avec l'activité locale des neurones, comme je l'ai montré dans ce travail de thèse.

Limitations des études

Ce travail de thèse a permis d'étudier les modifications moléculaires et cellulaires induites par la perte de fonction du gène *scn1Lab*. Cependant cette étude a été limitée aux stades précoces du développement du fait de la technique utilisée pour inactiver le gène *scn1Lab*. En effet, même les embryons injectés avec le morpholino *scn1Lab^{AUG}* présentent de nombreuses similitudes au niveau de la morphologie, de l'activité locomotrice et de l'activité neuronale, avec le mutant *scn1lab^{-/-}* (Brenet et al. 2019; Zhang et al. 2015), son utilisation limite la portée de nos études. De ce fait, notre étude de la réponse des cellules microgliales n'a été réalisée que durant les stades précoces de la maladie, une période durant laquelle les cellules microgliales sont encore immatures. De même, concernant l'évolution de la balance

excitation/inhibition, de la mort cellulaire cérébrale et de la neuro-inflammation. Dès lors, les comportements décrits ne sont peut-être que transitoires et il serait intéressant de poursuivre nos études à plus long terme afin de suivre l'évolution des différents paramètres en fonction de l'évolution de la maladie et ainsi de caractériser plus en détail leur implication dans la maladie.

Il est aussi difficile de conclure quant à l'implication des cellules microgliales dans l'hyperexcitabilité neuronale. En effet, ces cellules ont un rôle extrêmement important au cours du développement et les modifications observées suite à leur ablation génétique pourraient résulter de défauts développementaux dus à la non-colonisation du cerveau par les microglies et non d'un défaut lié à l'absence de ces cellules durant les crises. Les embryons *scn1Lab*-KD, présentant des crises dès 4 jours post-fertilisation, soit un peu plus de 24 heures après le début de la colonisation du cerveau par les microglies. Ainsi, quelle que soit la technique d'ablation de la microglie utilisée, il sera très difficile de séparer les conséquences développementales, des conséquences directes de l'absence des microglies sur l'activité neuronale. Le modèle *scn1Lab* ne permet donc pas de conclure sur le rôle des cellules microgliales dans l'épileptogenèse *via* leur ablation. En revanche, même si l'ablation totale de la microglie est toujours une technique dont les conséquences sont complexes, la méthode fondée sur l'expression d'une nitroréductase bactérienne (Pisharath and Parsons 2009) pourrait permettre d'étudier les conséquences de l'absence de ces cellules, une fois les crises récurrentes installées, mais après que les microglies aient joué leur rôle au cours des stades précoces du développement du cerveau. Cette approche est en cours de développement dans l'équipe.

L'étude des conséquences du traitement des larves *scn1Lab*-KD avec la carbétocine doit encore être approfondie. Tout d'abord, nous ne savons pas si les modifications observées sont dues à une action directe de la carbétocine sur les neurones ou si son effet est indirect et passe par les cellules microgliales. Une façon de répondre à cette question serait d'éliminer les cellules microgliales puis d'étudier si la carbétocine a toujours un effet calmant sur les crises. En effet, comme nos travaux ont montré que même en absence des cellules microgliales, les embryons *scn1Lab*-KD font des crises épileptiformes, une activité calmante de la carbétocine sur ces embryons serait la preuve que cette molécule agit directement sur les neurones. De même, nos travaux ne permettent pas de montrer que la carbétocine protège de manière pérenne le cerveau contre les crises car elle pourrait juste retarder leur

apparition. Pour ce faire, il faudrait enregistrer l'activité neuronale des larves qui auraient été traitées avec la carbétocine sur une plus longue période en utilisant le mutant *scn1Lab^{-/-}*. Enfin, nous ne savons si la carbétocine peut calmer des crises déjà présentes. En effet, la carbétocine pourrait être un modulateur de l'épileptogenèse sans avoir d'effets directs sur l'excitabilité neuronale. Dès lors, la carbétocine pourrait représenter un traitement préventif contre l'apparition des crises.

CHAPITRE V :
CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Conclusions

Les épilepsies constituent l'une des maladies neurologiques les plus fréquentes dans le monde. Il s'agit en effet d'un trouble caractérisé par une hyperactivité synchrone, spontanée et récurrente de population de neurones dans le cerveau. Parce qu'il s'agit d'une altération du fonctionnement des neurones, les recherches scientifiques et cliniques ont longtemps concentré leurs efforts sur la compréhension du fonctionnement de ces cellules. De ce fait, les traitements qui ont été découverts à ce jour, sont entièrement focalisés sur la diminution directe de l'excitabilité des neurones, dans le but de réduire la fréquence et l'intensité des crises. Cependant, même si ces traitements permettent d'atteindre un contrôle plus ou moins efficace des crises dans 70% des cas, un tiers des patients, notamment dans les épilepsies pédiatriques, ne répondent pas à ces molécules, les laissant ainsi sans véritable traitement. C'est pourquoi, la découverte de nouvelles voies thérapeutiques est essentielle. Pour y arriver, il est alors nécessaire d'étudier les mécanismes biologiques menant à l'apparition des crises.

Ce travail de thèse a ainsi permis de mieux caractériser les modifications cellulaires et moléculaires qui participent à la physiopathologie des épilepsies. En utilisant deux modèles d'épilepsie chez le poisson zèbre, l'un génétique, et l'autre environnemental, nous avons pu montrer l'existence d'un déséquilibre synaptique et neuronal de la balance excitation/inhibition en faveur de l'excitation, ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire cérébrale. Ces résultats confirment ainsi l'importance d'un déséquilibre de la balance excitation/inhibition dans les épilepsies et montrent les conséquences des crises récurrentes sur la survie des cellules cérébrales.

Dans la continuité des études précédentes, nos observations *in vivo* des cellules microgliales dans le cerveau des embryons *scn1Lab-KD*, ont montré une modification de la morphologie de ces cellules qui deviennent plus amiboïdes et moins ramifiées, associée à une forte augmentation de leur mobilité. Ces changements phénotypiques sont accompagnés par une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats montrent que l'hyperexcitabilité neuronale causée par une mutation génétique, induit une activation partielle des cellules microgliales ainsi que le déclenchement d'une neuro-inflammation qui pourrait, à terme, être néfaste pour les neurones. D'un autre côté, l'ablation génétique des cellules microgliales dans le modèle Dravet a montré que les embryons *scn1Lab-KD* développent des crises épileptiformes, même en absence de la microglie, ce qui montre que

l'apparition des crises, dans ce modèle génétique, ne dépend pas de mécanismes impliquant les cellules microgliales. Cette étude a aussi montré une augmentation de l'intensité des crises en absence de la microglie, soulignant ainsi l'importance de ces cellules au cours du développement et dans la modulation de l'excitabilité neuronale. Ainsi, nos travaux montrent que malgré leur activation partielle et l'induction d'une neuro-inflammation, les cellules microgliales semblent jouer un rôle bénéfique qui diminue les crises d'épilepsie dans le modèle poisson zèbre du syndrome de Dravet.

Enfin, une étude préalable faite par l'équipe avait montré les capacités anti-inflammatoire et modulatrice de l'activité microgliale de la carbétocine, un agoniste de l'ocytocine. A partir de ces données, nous avons voulu tester les effets de cette molécule dans les épilepsies. De manière intéressante, nous avons montré qu'un traitement des embryons *scn1Lab*-KD avec la carbétocine réduit la fréquence des crises épileptiformes et atténue les dommages neuronaux ainsi que les troubles moteurs qui leur sont associés. Cette diminution de l'hyperexcitabilité neuronale s'accompagne aussi d'une diminution de l'activation des cellules microgliales. Ainsi, la carbétocine, utilisée avant les premières crises dans le syndrome de Dravet, permet de prévenir, tout du moins partiellement, la survenue des crises. Toutefois, les mécanismes d'action de cette molécule restent encore inconnus.

Ses travaux de thèse illustrent la grande diversité et la puissance, des techniques et des approches qui sont disponibles dans le modèle de l'embryon de poisson zèbre afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des maladies neurologiques comme les épilepsies, et ainsi ouvrir la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques, dont les approches personnalisées de la médecine du futur.

Perspectives

Étude de l'implication de la balance excitation/inhibition dans l'initiation des crises d'épilepsies

Au cours de ce travail de thèse, nous avons observé un défaut de la balance excitation/inhibition dans les deux modèles que nous utilisons. Cependant, nous ignorons si ce défaut est présent avant l'apparition des premières crises et pourrait donc être à leur origine, ou si, au contraire, ce déséquilibre est causé par l'hyperexcitabilité neuronale. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la répartition de la densité des synapses excitatrices et inhibitrices avant et après l'apparition des crises épileptiformes. De plus, comme il existe plusieurs types d'épilepsie, il n'y a peut-être pas de réponse unique à cette interrogation et l'incidence des défauts de cette balance peuvent ainsi varier d'une épilepsie à une autre. Notre équipe réalise actuellement une étude comparative dans plusieurs modèles d'épilepsie, à la fois génétiques, grâce aux mutants *scn1Lab^{-/-}* (Scott C. Baraban et al. 2013), *depdc5^{-/-}* (Swaminathan et al. 2018), *gabra1^{-/-}* (Samarut et al. 2018) et *gabrg2^{-/-}* (Liao et al. 2019), mais aussi pharmacologiques avec le PTZ ou le DFP (Baraban et al. 2005; Brenet et al. 2020). Cette étude comparative pourrait ainsi permettre de clarifier l'implication de cette balance dans l'épileptogénèse. De plus, l'étude des mécanismes menant à ce déséquilibre, je pense notamment à l'élagage synaptique par les cellules microgliales, pourrait conduire à la découverte de nouvelles voies thérapeutiques visant, soit à empêcher l'apparition des crises, soit à diminuer la fréquence de ces événements, voire à les arrêter complètement. De plus, comme discuté précédemment, de nombreuses études supposent que la balance excitation/inhibition ne serait pas statique, mais qu'elle évoluerait en fonction des conditions cérébrales et, notamment, en fonction de la neuro-inflammation. Il serait alors intéressant d'utiliser nos modèles d'épilepsie chez le poisson zèbre combinés avec des lignées transgéniques marquant les synapses excitatrices et inhibitrices (Du et al. 2018; Jontes and Emond 2012) afin de suivre la dynamique en temps réel de la balance excitatrice/inhibitrice au niveau d'un cerveau entier au moment de l'induction des crises d'épilepsie dans nos modèles inductibles, comme, par exemple, les modèles *gabra1^{-/-}* (Samarut et al. 2018) ou *gabrg2^{-/-}* (Liao et al. 2019).

Étude longitudinale des modifications biologiques impliquées dans l'hyperexcitabilité neuronale

L'utilisation du morpholino *scn1Lab^{AUG}* réduit la portée de notre étude des défauts moléculaires et cellulaires prenant place suite à la perte de fonction du gène *scn1Lab*, aux stades précoces de la maladie. Ainsi, il serait intéressant de tirer profit du mutant *Didy^{S552}* afin de poursuivre nos études à des stades plus avancés et ainsi de caractériser de manière plus approfondie les modifications biologiques en lien avec l'hyperexcitabilité neuronale. Il faudrait tout d'abord étudier le profil d'excitabilité neuronale des mutants *scn1Lab^{-/-}* par imagerie calcique des neurones de 4 à 8 jpf. Une fois l'évolution de l'excitabilité neuronale des mutants *scn1Lab^{-/-}* établie, on pourra ensuite, aux mêmes stades, (1) observer le phénotype des cellules microgliales, en quantifiant leur morphologie et leur dynamique ; (2) quantifier le profil inflammatoire du cerveau des mutants *scn1Lab^{-/-}*, en quantifiant l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le Tnf α ; (3) évaluer la mort cellulaire cérébrale par des marquages *in vivo* à l'acridine orange et (4) étudier l'équilibre de la balance excitation/inhibition (E/I). Une fois ces profils établis, il serait alors possible de tenter de réduire l'hyperactivité neuronale avec des anticonvulsivants, comme le valproate ou le diazépam, puis d'observer les conséquences sur les phénotypes de la microglie, l'état neuro-inflammatoire, la mort cellulaire et la balance E/I. On pourrait aussi diminuer la neuro-inflammation avec la carbétocine ou d'autres molécules anti-inflammatoires modulatrices de l'activation microgliale, pour étudier les conséquences sur l'activité neuronale, la mort cellulaire et la balance E/I. De même, pour l'implication des cellules microgliales, l'étude des conséquences de leur absence sur une hyperexcitabilité déjà installée pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de ces cellules face aux crises. En particulier, une modulation plus fine de l'activité de ces cellules, comme par l'inactivation du récepteur purinergique P2Y₁₂, ou des enzymes CD39 et CD72, identifiées par Badimon et al. (Badimon et al. 2020), pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité neuronale par les microglies.

Étude comparative du transcriptome des cellules microgliales dans différents modèles d'épilepsies chez le poisson zèbre

La microglie, par l'élagage synaptique et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi par leur capacité à moduler l'excitabilité neuronale, pourrait être au centre de la physiopathologie des épilepsies. Nos résultats montrent que les cellules microgliales auraient

un rôle neuro-protecteur envers les neurones hyperexcités. Ces cellules pourraient influencer l'excitabilité des neurones, soit en libérant à proximité de ceux-ci des médiateurs qui modèleraient leur activité *via* des récepteurs membranaires, soit en agissant directement par contact direct. Afin d'identifier les mécanismes sous-tendant cette capacité, il faudrait faire une analyse du transcriptome des cellules microgliales dans les embryons *scn1Lab^{-/-}*, dans un premier temps. De plus, comme le rôle des cellules microgliales pourrait évoluer en fonction des différentes périodes de la maladie, il serait intéressant d'analyser les modifications du transcriptome de ces cellules à différents stades de la maladie. Il faudrait alors se concentrer sur 3 phases différentes : avant l'apparition des crises pour étudier les mécanismes microgliaux à l'œuvre durant la phase d'installation, au cours de la période d'initiation des crises, puis une fois que la maladie est bien installée. Ainsi, il devrait être possible de faire la différence entre la réponse primaire de la microglie et la réponse à plus long terme de ces cellules. Étant donné que les cellules microgliales sont très sensibles aux modifications de leur environnement, la méthode de TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) (Boulay et al. 2019), une méthode plus rapide et moins agressive que l'isolement de la microglie, devrait permettre d'isoler les ARNm microgliaux sans que les microglies n'aient le temps de modifier leur transcriptome. Cette technique repose sur la création de lignées transgéniques qui expriment spécifiquement dans les cellules d'intérêt, une protéine de fusion constituée de la GFP et de la protéine ribosomale rpL10a, permettant ainsi le marquage des ribosomes par un épitope GFP et, par conséquent, leur immuno-précipitation en utilisant des anticorps anti-GFP. Pour cela, une lignée transgénique exprimant la protéine GFP-rpL10a dans les cellules microgliales de poisson zèbre, la lignée Tg[UAS:eGFP-rpL10a] a été produite dans notre équipe (Yanicostas et al.). Cette lignée a ensuite été croisée avec la lignée transgénique Tg[pU1:Gal4/UAS:RFP], afin de cibler l'expression dans les macrophage et les microglies, puis avec des mutants *scn1Lab^{+/-}*. Il faudra disséquer le cerveau des embryons *scn1Lab^{-/-}*, immuno-précipiter les polyribosomes de la microglie, purifier les ARNm qui seront alors séquencés par RNA-Seq. L'analyse comparative du transcriptome de la microglie dans une situation physiologique et aux différents stades du contexte pathologique, devrait nous permettre d'identifier des gènes impliqués dans la réponse microgliale à l'hyperexcitabilité neuronale ainsi que dans leur activité neuro-modulatrice. Le rôle de ces gènes ainsi que leur implication dans les épilepsies pourront ensuite être étudiés en inhibant leur activité, soient par des morpholinos, soient avec les mutants stables créés par la méthode CRISPR-Cas9. Les gènes

candidats les plus intéressants pour leur rôle dans la modulation de l'hyperexcitabilité neuronale seront ensuite étudiés dans les modèles rongeurs pour des études plus complexes, notamment sur le comportement et la sémiologie des crises. Enfin, un des objectifs de notre équipe est de faire, une étude comparative de la réponse microgliale dans les différents modèles génétiques d'épilepsie chez le poisson zèbre (*gabra1*^{-/-}, *gabrg2*^{-/-} *depc5*^{-/-}) (Liao et al. 2019; Samarut et al. 2018; Swaminathan et al. 2018), qui devrait permettre d'identifier une signature microgliale commune aux différentes formes d'épilepsie.

ANNEXES

Avant-Propos

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de prendre part à des travaux annexes en collaboration avec les autres membres de mon équipe d'accueil.

Annexe 1. J'ai pu participer aux travaux de thèse de Rahma Hassan-Abdi, portant sur l'étude de la dynamique des cellules microgliales dans le contexte des tauopathies. J'ai donc pu contribuer à l'imagerie *in vivo* des cellules microgliales ainsi qu'à la quantification de leur morphologie.

Annexe 2. Ensuite, j'ai pu apporter mes connaissances et mes conseils à Julie Somkhit lors du développement d'une nouvelle méthode permettant d'évaluer la consommation d'oxygène en temps des larves de poisson zèbre.

Annexe 3. Enfin, j'ai continué le travail que Rahma Hassan-Abdi a initié au cours de son année de post-doctorat. Ce travail portait sur l'étude des conséquences d'une exposition précoce des embryons de poisson zèbre à un pesticide de la famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase : le bixafen. J'ai plus précisément conduit la révision de son article qu'elle avait soumis juste avant de quitter le laboratoire. Ainsi, j'ai complété son travail en effectuant une analyse plus précise des défauts morphologiques des larves induit par l'exposition au bixafen. De même, j'ai quantifié l'activité locomotrice des larves exposées au bixafen. J'ai ainsi pu montrer une corrélation entre les défauts de maturation des motoneurons et une diminution de l'activité locomotrice des larves.

Ces différents travaux m'ont permis de consolider mes compétences d'imagerie *in vivo* à différents stade de développement mais aussi d'étoffer mes connaissances des paramètres utiles à la quantification de la morphologie des différentes cellules du système nerveux, et notamment des cellules microgliales. De même, j'ai pu acquérir de nouvelles compétences, notamment en toxicologie, grâce à l'étude des conséquences de l'exposition au bixafen sur le développement du système nerveux des embryons. Enfin, ces études m'ont permis d'apprécier la diversité de l'utilisation des larves de poissons zèbre en biologie ainsi qu'en neurosciences.

Article annexe 1. “Neurons expressing pathological Tau protein trigger dramatic changes in microglia morphology and dynamics”

Rahma Hassan-Abdi, **Alexandre Brenet**, Mohamed Bennis, Constantin Yanicostas, & Nadia Soussi-Yanicostas

Publié le 7 Novembre 2019 dans **Frontiers in Neuroscience** (IF : 3,707)
doi : 10.3389/fnins.2019.01199

Présentation de l'article

Les cellules microgliales sont des cellules hématopoïétiques polyvalentes qui protègent le système nerveux central des différents dangers. Néanmoins, en dépit de leurs fonctions primaires protectrices largement démontrées, certains résultats suggèrent aussi que ces cellules pourraient être impliquées dans le développement de plusieurs maladies neurodégénératives, dont les tauopathies. Ces maladies constituent une classe hétérogène de pathologies, dont le trait commun caractéristique majoritaire est la présence d'agrégats protéiques filamenteux intra-neuronaux principalement constitué de la protéine Tau sous une forme hyperphosphorylée. Si ces agrégats de Tau semblent être la cause primaire de la mort des neurones, la réaction des cellules microgliales et leurs rôles dans l'évolution de la maladie restent encore mal caractérisés et mal compris. Pour mieux comprendre la réaction des cellules microgliales dans ce contexte pathologique, nous avons combiné un modèle transgénique d'une tauopathie humaine chez le poisson zèbre avec une lignée transgénique qui exprime un marqueur cellulaire fluorescent permettant de visualiser les cellules microgliales *in vivo* en temps réel. Ce travail alors met en lumière pour la première fois le comportement et les réorganisations de l'architecture cellulaire, en temps réel, des cellules microgliales dans un modèle animal de tauopathie. De plus, l'étude des conséquences de l'ablation de la microglie permet d'émettre l'hypothèse que ces cellules jouent un rôle principalement protecteur au cours de la maladie en phagocytant exclusivement les cellules apoptotiques, limitant ainsi la propagation des agrégats nocifs. Néanmoins, nos observations suggèrent aussi que les cellules microgliales semblent « submergées » par le nombre de cellules apoptotiques dans le contexte du modèle de tauopathie. Ces travaux soutiennent alors que les approches thérapeutiques visant à améliorer les capacités phagocytaires des cellules microgliales pourraient être une voie de recherche intéressante.



Neurons Expressing Pathological Tau Protein Trigger Dramatic Changes in Microglial Morphology and Dynamics

Rahma Hassan-Abdi^{1,2}, Alexandre Brenet^{1,2}, Mohamed Bennis³, Constantin Yanicostas^{1,2} and Nadia Soussi-Yanicostas^{1,2*}

¹ INSERM, UMR1141, Hôpital Robert Debré, Paris, France, ² Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ³ Université Cadi Ayyad, Marrakesh, Morocco

OPEN ACCESS

Edited by:

Efthimios M. C. Skoulakis,
Alexander Fleming Biomedical
Sciences Research Center, Greece

Reviewed by:

Bogdan Catalin,
University of Medicine and Pharmacy
of Craiova, Romania
Kimberly R. Byrnes,
Uniformed Services University of the
Health Sciences, United States

*Correspondence:

Nadia Soussi-Yanicostas
nadia.soussi@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neurodegeneration,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 07 August 2019

Accepted: 22 October 2019

Published: 07 November 2019

Citation:

Hassan-Abdi R, Brenet A, Bennis M,
Yanicostas C and
Soussi-Yanicostas N (2019) Neurons
Expressing Pathological Tau Protein
Trigger Dramatic Changes in Microglial
Morphology and Dynamics.
Front. Neurosci. 13:1199.
doi: 10.3389/fnins.2019.01199

Microglial cells, the resident macrophages of the brain, are important players in the pathological process of numerous neurodegenerative disorders, including tauopathies, a heterogeneous class of diseases characterized by intraneuronal Tau aggregates. However, microglia response in Tau pathologies remains poorly understood. Here, we exploit a genetic zebrafish model of tauopathy, combined with live microglia imaging, to investigate the behavior of microglia *in vivo* in the disease context. Results show that while microglia were almost immobile and displayed long and highly dynamic branches in a wild-type context, in presence of diseased neurons, cells became highly mobile and displayed morphological changes, with highly mobile cell bodies together with fewer and shorter processes. We also imaged, for the first time to our knowledge, the phagocytosis of apoptotic tauopathic neurons by microglia *in vivo* and observed that microglia engulfed about as twice materials as in controls. Finally, genetic ablation of microglia in zebrafish tauopathy model significantly increased Tau hyperphosphorylation, suggesting that microglia provide neuroprotection to diseased neurons. Our findings demonstrate for the first time the dynamics of microglia in contact with tauopathic neurons *in vivo* and open perspectives for the real-time study of microglia in many neuronal diseases.

Keywords: microglia, tauopathy, Tau protein, zebrafish, *in vivo* imaging, Tau hyperphosphorylation, pro-inflammatory cytokines

INTRODUCTION

Microglia, the resident brain macrophages, are highly plastic and multifunctional cells that continuously monitor the health of neuronal networks (Kierdorf and Prinz, 2017). In a physiological context, microglia display long cytoplasmic processes that constantly extend and retract to contact neighbor neurons and check their physiology (Nimmerjahn et al., 2005; Peri and Nüsslein-Volhard, 2008). Microglia also respond promptly to brain injury or infection, with both immuno-protective and cytotoxic responses, including the secretion of a large set of cytokines (Hanisch, 2002; Wake et al., 2013; Hu et al., 2015; Butovsky and Weiner, 2018) and increased phagocytic capacities to eliminate pathogen debris and dead cells (Leong and Ling, 1992; Ling and Wong, 1993; Brockhaus et al., 1996; Nakajima and Kohsaka, 2001; Hanisch and Kettenmann, 2007; Thameem Dheen et al., 2007). However, in some disease contexts, such as tauopathies, microglia also appear to have harmful activities (Bhaskar et al., 2010; Eyo and Dailey, 2013; Maphis et al., 2015b; Laurent et al., 2018).

Tauopathies are a family of neurodegenerative disorders characterized by intra-neuronal fibrillary aggregates containing abnormally hyperphosphorylated isoforms of the microtubule-associated protein Tau (Spillantini and Goedert, 2013; Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015; Wang and Mandelkow, 2016). While the causal role of Tau in the disease is supported by several inherited tauopathies triggered by dominant missense mutations in the protein, such as Tau^{P301L}, causing fronto-temporal dementia with parkinsonism on chromosome 17 (FTDP-17) (Hutton et al., 1998), the etiology of these disorders and the contribution of microglia to their physiopathology remain poorly understood (Hansen et al., 2018; Laurent et al., 2018; Perea et al., 2018).

Because of their plasticity and well-established neuroprotective activities, microglial cells are very promising therapeutic targets for the treatment of neuron disorders, including neurodegenerative diseases.

In an attempt to describe the behavior of microglial cells in a tauopathy disease context *in vivo*, we used the transgenic zebrafish Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) tauopathy model (Paquet et al., 2009) and live microglia imaging (Peri and Nüsslein-Volhard, 2008). We observed that in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons, microglia display dramatic changes in morphology and dynamics, with cells showing fewer and shorter branches and amoeboid-like cell bodies alongside a markedly increased mobility and phagocytic activity. We also imaged the phagocytosis of dying neurons by microglia and showed that these cells could phagocytose nearly twice as much as in homeostatic brains. However, we also observed that these microglial cells failed to phagocytose all dead neurons, highlighting the limits of their phagocytosing abilities.

RESULTS

Microglia Display Dramatic Changes in Shape and Dynamics in the Presence of hTau^{P301L}-Expressing Neurons

To investigate the behavior of microglial cells in a tauopathy disease context *in vivo*, we used the transgenic Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) zebrafish model of Tau-induced neurodegeneration, combined with the transgenic Tg(ApoE-eGFP) microglia marker line. As previously shown, in the optic tectum (Figure 1Q) of Tg(ApoE-eGFP) embryos, microglia displayed a ramified morphology, with a small cell body and several elongated branches (Figures 1A,C). By contrast, in Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) microglia displayed a rounder morphology, with a larger cell body and fewer, shorter branches (Figures 1B,B',D). Quantifications of morphological parameters confirmed these dramatic changes in microglia morphology seen in the presence of diseased neurons, with a smaller surface area (Figure 1E) and volume (Figure 1F); and a greater sphericity (Figure 1G). However, alongside these rounded microglia, a few branched cells were also observed in the disease context (Figures 1B,B').

Given that microglial cells are highly dynamic, we used *in vivo* real-time confocal imaging combined with Imaris

software (Bitplane Inc.) image analysis to determine whether the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons modified microglia dynamics. In Tg(ApoE-eGFP) embryos, microglia displayed dynamic processes that were constantly extending and retracting, while their cell bodies remained almost immobile (Figures 1H,J, Supplementary Videos 1, 5, Supplementary Figures 1A,C). By contrast, in Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos, microglia were highly mobile with their cell bodies traveling over longer distances (Figures 1I,K, Supplementary Videos 1, 6, Supplementary Figures 1B,D). Quantifications of microglia dynamics confirmed that in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons, microglia displayed increased mean process speed (Figure 1L) and mean process track displacement (Figure 1M), and a much larger displacement of the cell bodies over a similar time frame (Figure 1N).

To further characterize the phenotype of microglial cells exposed to hTau^{P301L}-expressing neurons, we analyzed the expression levels of the pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-8, and TNF- α in the brain tissue of transgenic Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) and wild-type embryos. Unexpectedly, none of these cytokines were overexpressed in the pathologic context, the two tested groups displaying no significant differences in expression levels of IL-1 β , IL-8 (Figures 1O,P), and TNF- α (data not shown).

Genetic Depletion of Microglia Worsens Pathology in Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) Embryos

As a first attempt to investigate the function of microglial cells in Tau pathology, we generated Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos completely devoid of microglia following injection of an antisense morpholino oligonucleotide targeting pU.1 (MO-pU1) transcripts encoding a transcription factor essential for proper differentiation of macrophage/microglia (Rhodes et al., 2005), and then studied the consequences of such microglial cell ablation on Tau phosphorylation, neuron apoptosis, and expression of pro-inflammatory cytokines. Injection of the MO-pU1 (Figure 2A) leads to a complete absence of microglial cells in the brain of the embryos as shown by either Neutral Red staining (Figure 2B), or immunocytochemistry using L-plastin antibody (Figure 2C).

Using 5 dpf wild-type and transgenic Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos and microglia ablation following MO-pU1 injection, we first studied the consequences of the absence of microglia on the expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. Results showed that while expression of Tau^{P301L} did not stimulate overexpression of IL-1 β (Figure 2D) and IL-8 (Figure 2E) in embryos with microglia embryos, microglia depletion in Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos provoked a markedly increased expression of both these pro-inflammatory cytokines.

As a first attempt to determine the effect of the absence of microglia on Tau hyperphosphorylation *in vivo*, we quantified and compared hTau phosphorylation levels at Ser396 site in Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos with and without microglia (Figure 2F). Interestingly, in Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed)

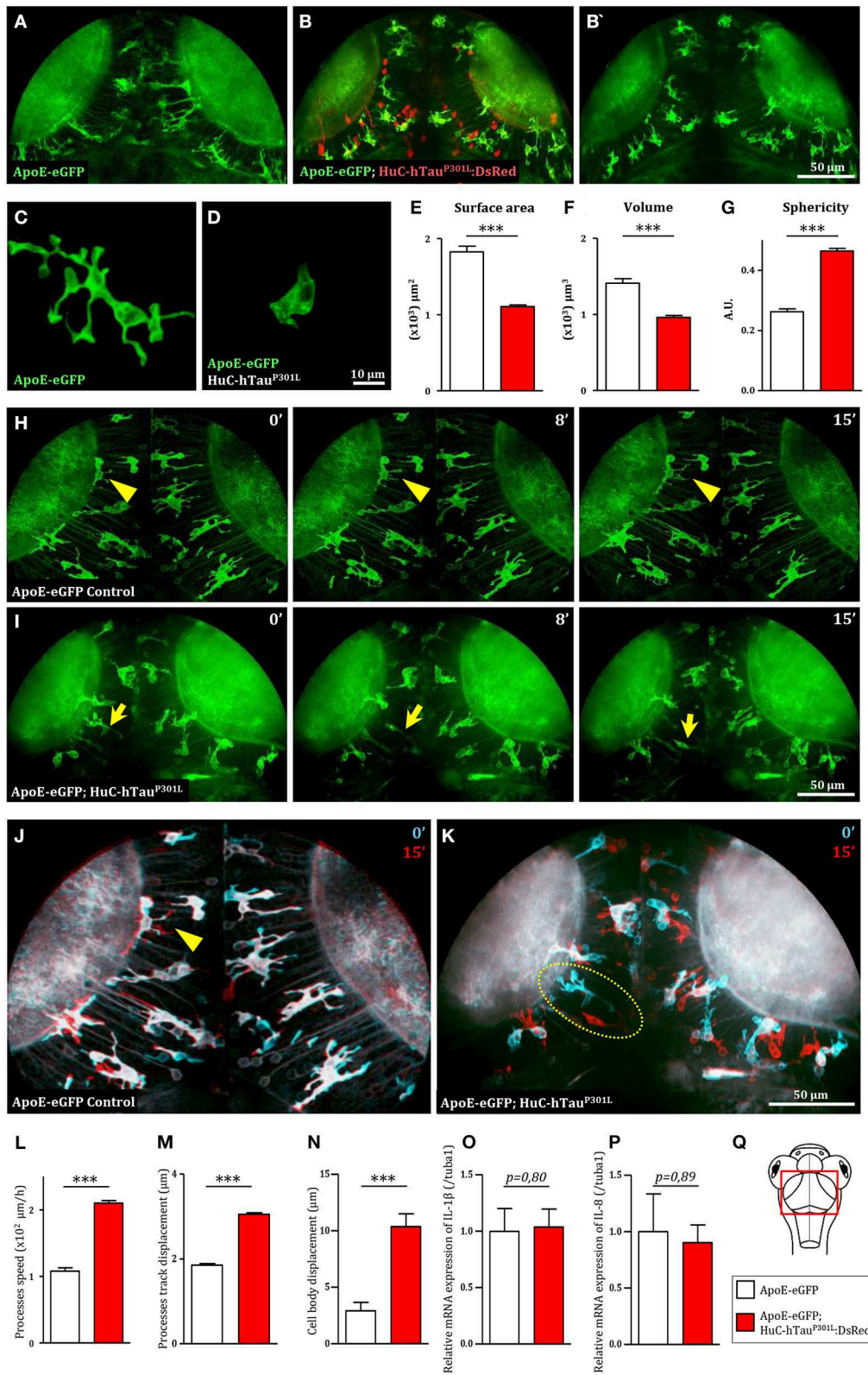


FIGURE 1 | Microglia displays dramatic changes in morphology and dynamics in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons. **(A,B,B')** Dorsal views of the optic tectum of 7 dpf Tg(ApoE-eGFP) **(A)** and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) transgenic embryos **(B,B')**, showed the characteristic ramified morphology of *(Continued)*

FIGURE 1 | microglia in wild-type (A), while in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons, microglial cells displayed shorter processes and larger cell bodies. (C,D) Detailed morphology of microglial cells in Tg(ApoE-eGFP) (C) and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos (D). (E–G) Measurements of microglia morphological parameters; surface area (E, $p < 0.0001$), volume (F, $p < 0.0001$), and sphericity (G, $p < 0.0001$), in Tg(ApoE-eGFP) ($n = 10$) and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) ($n = 24$) embryos, confirmed the cell shape changes observed in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons. (H,I) Time-lapse sequences of microglia dynamics in Tg(ApoE-eGFP) (H, **Supplementary Video 1**) and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos (I, **Supplementary Video 2**). (J,K) Merged images of two time points separated by 15 min from **Supplementary Video 1** (J) and **Supplementary Video 2** (K). The merged images at $t = 0$ min (cyan) and $t = 15$ min (red) highlighted the dramatic increased mobility of microglial cell bodies in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons. (L–N) Measurements of microglia dynamics; process speed (L, $p = 0.0004$), process track displacement (M, $p = 0.0002$) and cell body displacement (N, $p = 0.0054$), in Tg(ApoE-eGFP) ($n = 3$) and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) ($n = 4$) embryos, confirmed the increased mobility of both microglia processes and cell bodies observed in the presence of hTau^{P301L}-expressing neurons. (O,P) Measurements of pro-inflammatory cytokine expression in the brain of 5 dpf Tg(ApoE-eGFP) ($n = 6$) and Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) ($n = 11$) embryos. Comparison of the relative expression of IL-1 β (O, $p = 0.80$) and IL-8 (P, $p = 0.89$) in both groups shows no significant differences. (Q) Schematic dorsal view of a 7 dpf zebrafish embryo. The red square shows the region of interest that comprises the optic tectum. *** $p < 0.001$. Scale bar (A,B,B',H–K) = 50 μ m, (C,D) = 10 μ m. A.U., arbitrary units.

embryos without microglia, we observed an increased accumulation of hyperphosphorylated Tau when compared to that seen in their siblings with microglia (Figure 2F). Quantification of phospho-Tau to total Tau accumulation ratio (pTau/Tau) confirmed that hTau hyperphosphorylation levels were significantly increased in microglia-depleted Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos (Figure 2G). To further investigate the consequences of the absence of microglia on Tau hyperphosphorylation, Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nlrc3-like*^{st73/73}) mutant embryos, which are fully devoid of microglia as the result of homozygous *nlrc3-like*^{st73} mutation (Shiau et al., 2013), and analyzed hTau^{P301L} hyperphosphorylation using the antibody PHF1, targeting pathological phosphorylation sites Ser396 and Ser404 of the hTau protein (Figures 2H,I). In good agreement with Western blot analysis, a significant increase in PHF1 labeling intensity was observed in the telencephalon of 6 dpf Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nlrc3-like*^{st73/73}) mutant embryos (Figure 2I) when compared to that observed in the brain of their Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nlrc3-like*^{st73/+}) siblings with microglia (Figure 2H). Quantification of the signal ratio of hyperphosphorylated hTau protein on brain sections from Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nlrc3-like*^{st73/73}) embryos confirmed the significant increase of this ratio displayed in protein extracts from Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos microglia-depleted with morpholino (Figure 2J).

Microglia Phagocytic Activity Is Enhanced in the Presence of hTau^{P301L}-Expressing Neurons

As phagocytosis is a main feature of microglial cells, we first monitored the phagocytic activity of microglia in Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos. We observed the phagocytosis of hTau^{P301L}-expressing neurons by microglia, using confocal real-time imaging (Figures 3A,B, **Supplementary Video 3**). A microglial cell in the optic tectum (Figures 3B,C, 0 min) sends one of its processes to the pathological neuron (Figures 3B,C, 5 min) to draw it toward its cell body (Figures 3B,C, 9 min) and execute the digestion of the neuron and its debris until completion of the process (Figures 3B,C, 18 min). We also observed the detail of a microglial cell engulfing three neurons simultaneously (**Supplementary Figure 2, Supplementary Video 7**). We next assessed the phagocytic activity of microglia by quantifying the total engulfed volume, which was significantly increased in

Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos (Figure 3D). Given the critical role of microglia in removing apoptotic cells and other noxious elements, we next visualized neuronal death in Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos using the apoptotic marker Acridine Orange. Data showed that microglia specifically engulfed apoptotic neurons (Figures 3E–G, **Supplementary Video 4**) but not non-apoptotic hTau^{P301L}-expressing cells, supporting the notion that microglia specifically responds to signals sent by degenerating neurons that are already apoptotic but not hTau^{P301L}-expressing neurons *per se*. However, quantification of the number of non-engulfed apoptotic neurons in Tg(ApoE-eGFP; HuC-hTau^{P301L}:DsRed) and control Tg(ApoE-eGFP; HuC-RFP) embryos showed that microglia failed to phagocyte all apoptotic hTau^{P301L}-expressing neurons (Figure 3I).

DISCUSSION

To date, few studies have been conducted in *in vivo* conditions in healthy mice brains to show detailed morphological characterization of microglia (Cătălin et al., 2017; Sun et al., 2019). However, all studies aimed at investigating the physiology of microglia or their interactions with neurons in rodent models of neuronal diseases have relied widely on *ex vivo* and *in vitro* approaches, which cannot accurately reproduce the complexity of the physiological conditions observed in living brains (Hickman et al., 2013; Maphis et al., 2015a; Bemiller et al., 2017; Rustenhoven et al., 2018).

While these marker-based approaches remain useful to gather prerequisite knowledge on immune cells, it is nonetheless crucial to preserve the morphology and dynamics of these highly plastic cells, which respond to very small changes in the CNS, and so to study them in a living brain (He et al., 2018). Recent studies show that time spent by microglia *ex vivo* is associated with a different evolution of gene expression until their expression levels become the reverse of the initial measures (Gosselin et al., 2017).

The present work is, to our knowledge, the first aimed at characterizing the dynamic behavior of microglial cells in the presence of pathological neurons expressing a human mutant Tau protein, hTau^{P301L}, causing tauopathy.

Our results show that the presence of these hTau^{P301L}-expressing neurons caused dramatic changes to microglia, with the cells displaying an amoeboid-like shape and higher mobility. Although these morphological and dynamic changes

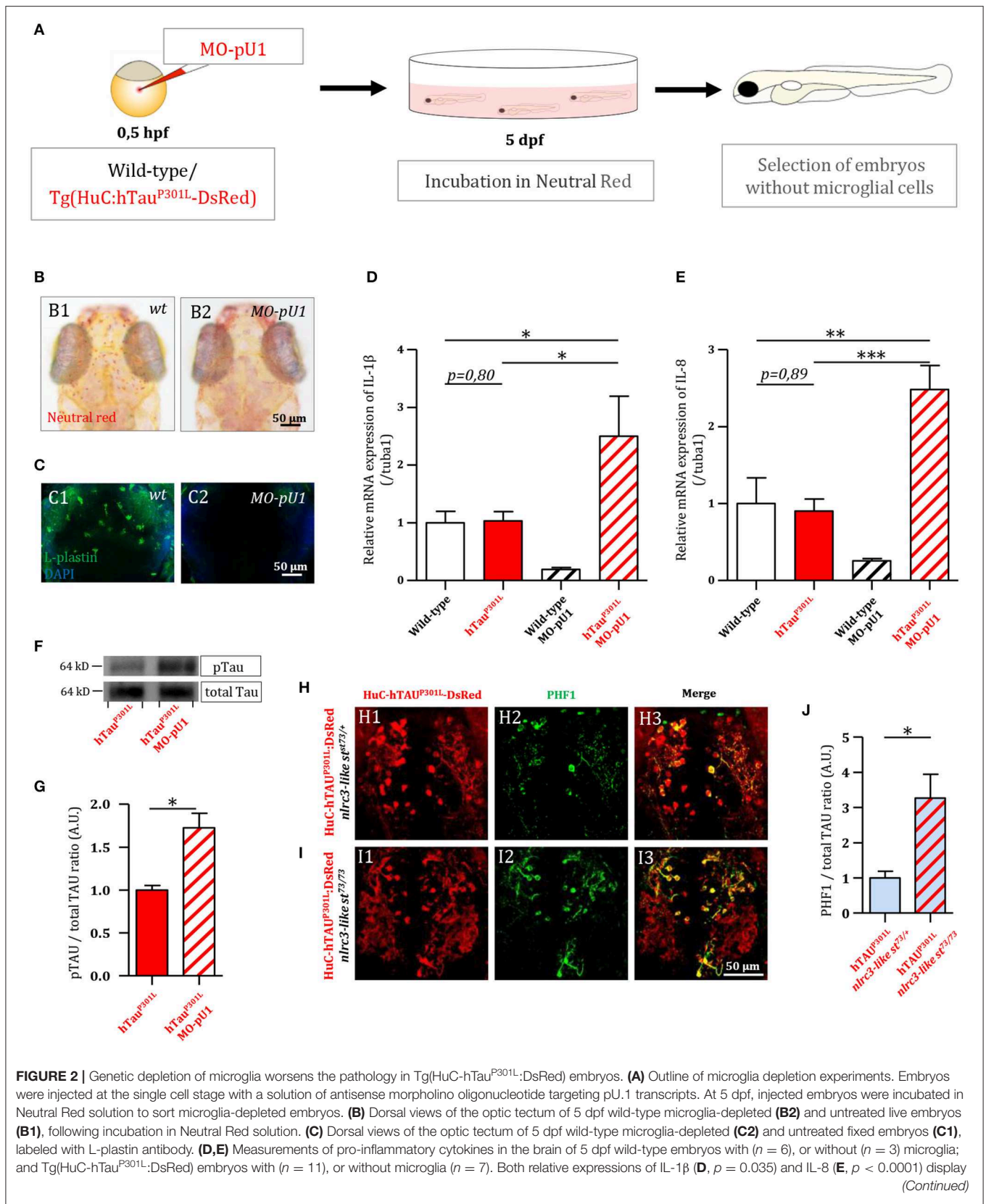


FIGURE 2 | a significant increase in the brains of Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos without microglia cells, compared to their siblings with microglial cells. **(F,G)** Representative Western blots membranes of total protein extracts from 6 dpf Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos with (left) or without (right) microglia, hybridized with antibodies against human total Tau (total Tau) or human phosphorylated Tau at Ser396 residue (pTau) **(F)**; and quantification of corresponding pTau/total Tau ratio (respectively, $n = 4$ and $n = 4$) **(G)**, $p = 0.01$). The ratio of hyperphosphorylated hTau to total Tau protein is significantly increased in microglia-depleted Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos. **(H–J)** Dorsal views of the telencephalon of 6 dpf Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nrc3-like^{st73/+}*) embryos **(H)** and Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nrc3-like^{st73/st73}*) embryos **(I)**, labeled with an antibody directed against human phosphorylated Tau at Ser396 and Ser404 residues (PHF1); and quantification of corresponding PHF1/hTau^{P301L}-DsRed signal ratio (respectively, $n = 4$ and $n = 6$) **(J)**, $p = 0.0485$). The quantification of the signal ratio of hyperphosphorylated hTau protein on brain sections from Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nrc3-like^{st73/st73}*) mutant embryos devoid of microglia confirmed the significant increase of this ratio displayed in protein extracts from Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos microglia-depleted with morpholino. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Scale bar **(B,C,H,I)** = 50 μ m.

are reminiscent of the classical microglial activation profile seen in response to injury or disease (Nakajima and Kohsaka, 2001), these rounded microglial cells did not overexpress known pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , and IL-8 showing that the observed changes were non-inflammatory (Zhao et al., 2018). However, genetic depletion of microglia in brains containing hTau^{P301L}-expressing neurons induced a markedly increased expression of both pro-inflammatory cytokines. This increased cytokine expression is reminiscent to that observed in a model of prion-induced neurodegeneration in mice (Zhu et al., 2016). One possible hypothesis is that astrocytes, the largest glial group, can also produce pro-inflammatory factors and exhibit a reactive state as it has been reported in tauopathy mice models (Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2017). This neuroinflammation could be exacerbated by the higher levels of pathological hyperphosphorylated Tau protein (Martini-Stoica et al., 2018; Perea et al., 2019).

In Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos, highly dynamic microglial cells displayed an intense phagocytic activity, specifically eliminating nearly twice as many apoptotic neurons as microglial cells in healthy brains. However, the significantly higher number of non-engulfed apoptotic neurons in tauopathic brains suggests that these microglial cells are overwhelmed by the excessive neuron death rate generated in this transgenic model. One therapeutic approach might thus be to enhance the phagocytic activity of microglia to slow the spread of the disease.

This study using intact zebrafish brain visualizes interactions between microglia and hTau^{P301L}-expressing neurons in real time and sheds light on microglia activities exerting a protective role mainly through specific phagocytosis of apoptotic hTau^{P301L}-expressing neurons, thereby limiting the spread of noxious cell bodies or pathologic hyperphosphorylated Tau (**Figure 4**). However, while displaying enhanced phagocytic activity toward hTau^{P301L}-expressing neurons and efficiently eliminating dead neurons, microglial cells appeared overwhelmed, as evidenced by the higher number of dead, albeit non-engulfed dead neurons in transgenic embryo brains. These findings support therapeutic approaches based on the modulation of microglial phagocytic activity in a specific neurodegenerative context.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

All the animal experiments described in the present study were conducted at the French National Institute of Health

and Medical Research (INSERM) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

Zebrafish Lines and Maintenance

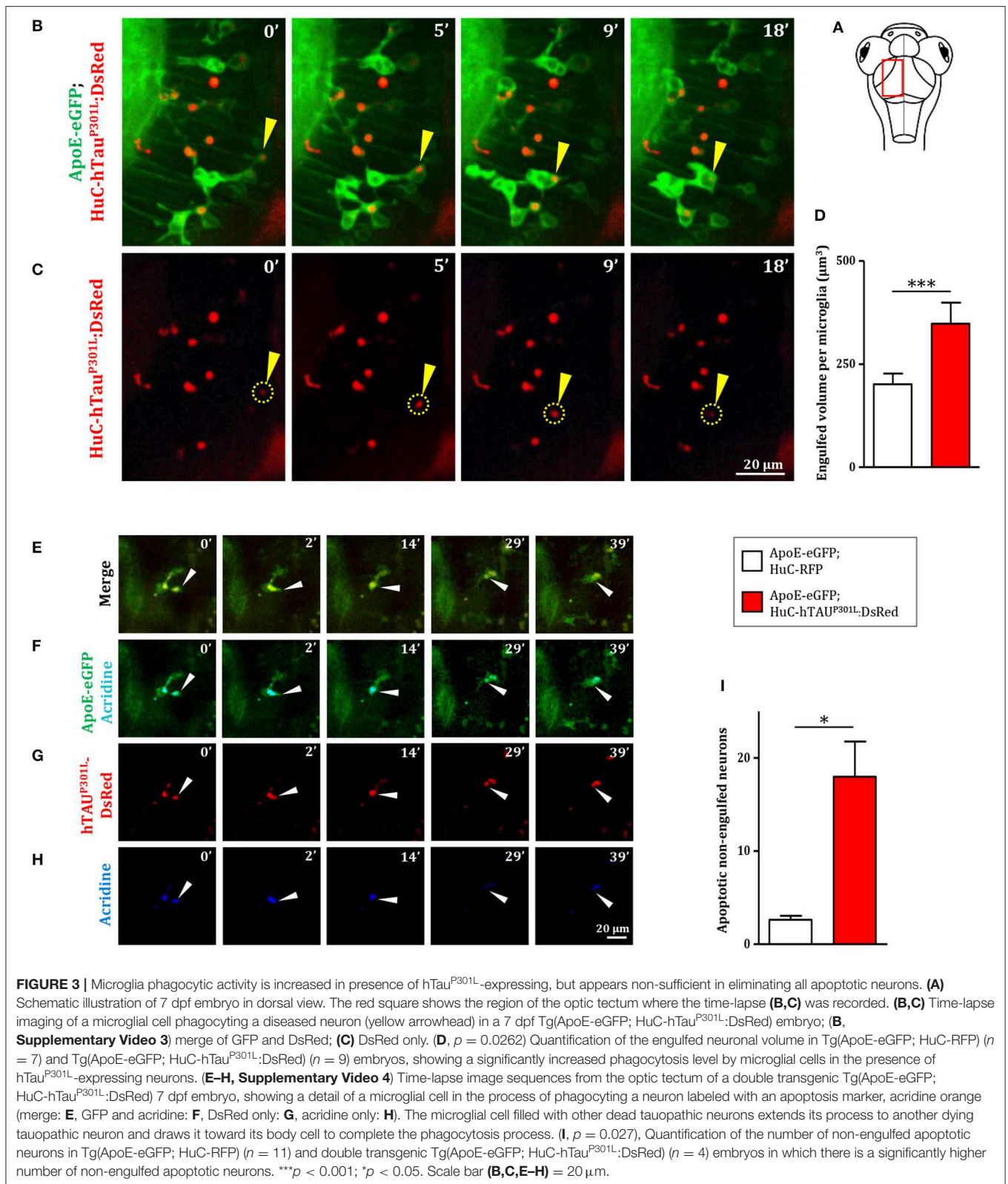
Zebrafish were maintained at 26.5°C in 14h light and 10h dark cycles. Embryos were collected by natural spawning and to avoid pigmentation, 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU) was added at 1 dpf (day post-fertilization). Transgenic Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed) embryos (Paquet et al., 2009), showing mosaic neuronal expression of hTau^{P301L} mutant protein, linked to FTDP-17, was used to reproduce key pathological features of tauopathy. In order to simultaneously observe microglia, we used the Tg(ApoE-eGFP) transgenic line (Peri and Nüsslein-Volhard, 2008) that allows live imaging of microglial cells with GFP. To investigate the consequences of the absence of microglia, we used the *nrc3-like^{st73/st73}* mutants (Shiau et al., 2013), in which the *st73* recessive loss of function mutation in the non-canonical NOD-like receptor (NLR) gene is responsible for the absence of microglia in the brain.

Confocal Imaging

For *in vivo* imaging, 7 dpf larvae were anesthetized with 112 μ g/ml 3-aminobenzoic acid ethyl ester (tricaine, Sigma), immobilized in 1.2% low melting-point agarose in the center of a 35 mm glass-bottomed dish (Corning®), and covered with E3 medium containing 112 μ g/ml tricaine. Images were acquired using a Leica SP8 confocal scanning laser microscope equipped with a Leica 20x/0.75 multi-immersion objective or an Olympus 40x/1.1 water objective; or a Leica DM6000FS Spinning disk L2 microscope equipped with a Leica 25x/0.95 water immersion objective. All the images were then processed using LAS-X (Leica), MetaMorph 7.8.9 (Molecular Devices), AutoQuant X3.1.1 (Media Cybernetics), Fiji (Version 2.0.0-rc-65/1.52b) and Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System).

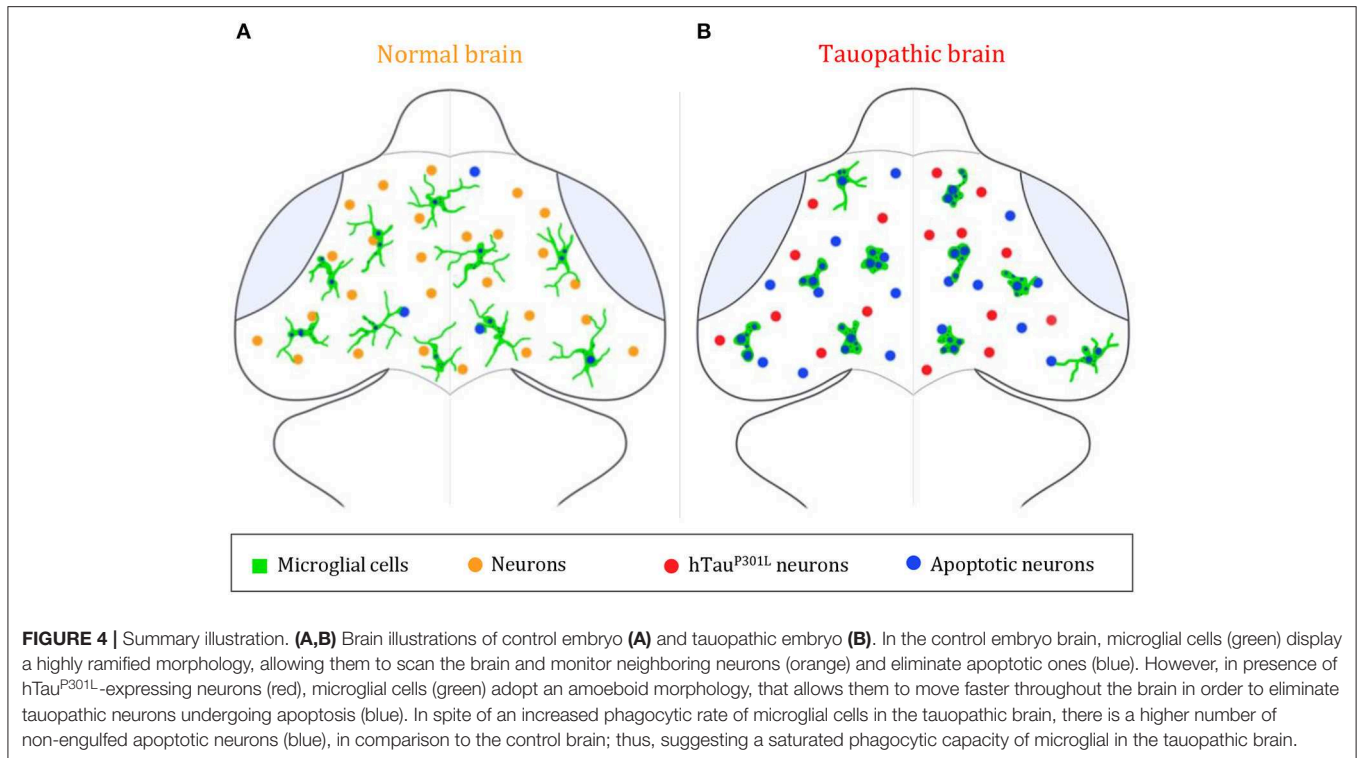
Image Analysis

The surface area, volume, and sphericity ($\Psi = \frac{\pi^{\frac{1}{3}}(6V_p)^{\frac{2}{3}}}{A_p}$) of microglial cells were quantified using Imaris MeasurementPro (Bitplane Inc.). The speed (distance traveled per unit



time) and displacement (distance between first and last positions) of microglial processes were analyzed using Imaris Filament tracer (Bitplane Inc.) on 15 min long

time-lapses. Microglial cell body displacements (distance between first and last positions) were tracked with Imaris MeasurementPro on 30 min long time-lapses.



Three-dimensional cell reconstructions were created using Imaris MeasurementPro.

Ablation of Microglia

Morpholino pU.1 (MO-pU1): 5'-GATATACTGATACTCCAT TGGTGGT-3' designed to inhibit *pU1* mRNA translation, was obtained from Gene Tools. 2 nl of a 0.5 mM solution, corresponding to 1 pmol of pU.1 morpholino was injected into 1–2 cells stage embryos using standard protocols. After injection, the embryos were incubated in E3 medium at 28.5°C until analysis at the desired stage. To select embryos in which microglia differentiation was fully blocked, Neutral Red staining was used to label microglia. Embryos were incubated in Neutral Red diluted in E3 medium (2.5 µg/mL) for 5–8 h at 28.5°C, and rinsed 10 min before examination using a stereomicroscope (Zeiss).

Apoptosis Labeling

To visualize apoptotic neurons, embryos were incubated in an Acridine Orange solution (1:500, VectaCell) for 20 min at 28.5°C in the dark, and rinsed twice for 10 min in E3 medium. Although both GFP and acridine orange have very close excitation and emission spectra, their signals are easily distinguishable, with acridine orange emitting a much more intense fluorescence. Therefore, GFP channel (green) also shows Acridine Orange staining (blue) (**Figure 3F**).

Immunohistochemistry

Six dpf Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nrc3-like*^{st73/+}) and Tg(HuC-hTau^{P301L}:DsRed; *nrc3-like*^{st73/73}) embryos were anesthetized in 0.2% tricaine, fixed with 4% paraformaldehyde, cryoprotected in 10% sucrose solution prior to flash freezing in isopentane. Samples were stored at –80°C until use. Embryos were cut into 20-µm-thick sections on cryostat, mounted on superfrost slides, and stored at –80°C. Cryosections (20 µm) were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. After washing thrice with PBS, sections were treated with 0.25% trypsin in 1X PBS for 2 min at 25°C. Immunohistochemistry was performed as previously described (Puvarel et al., 2009). Briefly, sections were blocked and permeabilized with 0.2% gelatin, 0.25% triton X-100 diluted in 1X PBS for 1 h at room temperature and then incubated overnight at room temperature with anti-PHF1 (1:100, mouse monoclonal, gift of Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA). After several washes, sections were incubated for 1 h with the donkey anti-mouse coupled to Alexa Fluor 488 (1:500, Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA). Sections were counterstained for 10 min with 0.1% DAPI (Sigma-Aldrich) before being mounted with vectashield mounting medium (Vector). Sections were analyzed using a leica TCS SP8 confocal scanning system (Leica Microsystems). Images were acquired using a Leica SP8 confocal scanning laser microscope equipped with a Leica 20x/0.75 multi-immersion objective. Images were processed with LAS-X (Leica), Fiji (Version 2.0.0-rc-65/1.52b) and Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System).

For whole mount immunostaining, 5 dpf wild-type embryos with or without microglia, were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 1 h 30 min at room temperature, washed three times in PBS (10 min each) and permeabilized in cold acetone (-20°C) for 20 min. After several washes, embryos were incubated in collagenase solution for 1 h. Immunohistochemistry was performed as described previously (Naini et al., 2018) using rabbit anti-zebrafish L-plastin polyclonal antibody (gift of Dr. Michael Redd, University College London, United Kingdom), followed by Alexa-coupled secondary anti-rabbit antibody (Molecular Probes) at 1:500 dilution. After washing, the fluorescence was analyzed using a Leica TCS SP8 confocal scanning system (Leica Microsystems). Images were collected using a Leica 20x/0.75 multi-immersion objective. Images were processed with LAS-X (Leica), Fiji (Version 2.0.0-rc-65/1.52b), and Adobe Photoshop 7.0 (Adobe System).

RT-qPCR

Total RNAs were extracted from independent batches of 15 embryos each, using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel, Germany). Concentration of RNAs were assessed by spectrophotometry using a NanodropTM device (ThermoFisher Scientific, USA). Total RNA (1 μg) samples were reverse transcribed using the iScriptTM cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA). RT-qPCR experiments were performed in triplicate using SYBR Green Super-mix (Bio-Rad, USA) according to a program of 40 cycles in three steps (denaturation of 5 s at 96°C , hybridization of 10 s at 60°C and extension of 10 s at 72°C). Primers were designed manually following visual inspection of gene sequences. Gene sequences and NCBI references are given in **Supplementary Table 1**. Specific mRNA levels were evaluated after normalization of the results with tubulin- α (*tuba1*) mRNA as reference, and the results were indicated in arbitrary units determined, respectively, to the levels of RNA determined in wild-type embryos and assessed using a Welch two-sample *t*-test or an ANOVA followed by a Tukey post-test.

Western Blot

Five dpf embryos were collected, anesthetized, and lysed on ice with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 320 mM Sucrose, pH 7.4) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Lysates were homogenized by sonication (thrice 10 s) and centrifuged at 600 g for 10 min. Samples containing 10 μg proteins were subjected to SDS-PAGE in 4–20% gradient acrylamide gel. Primary antibody against phosphorylated tau, Ser396 (1:1,000, mouse monoclonal, Ozyme); and anti-human total tau antibody (1:1,000, rabbit polyclonal, Dako Cytomation) were used. Subsequently, the blots were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, 1:5,000, Cell Signaling Technology) diluted in bovine serum albumin solution and developed with ECL RevealBLOT[®] Plus (Ozyme) following manufacturer's instructions. All statistics were assessed using a Welch two-sample *t*-test and all data are indicated as means \pm SEM.

Statistics

All statistics were assessed using a Welch two-sample *t*-test or an ANOVA followed by a Tukey post-test. All data are represented as means \pm SEM.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NS-Y conceived and designed the study and edited the manuscript. RH-A performed all experiments, data analysis, and edited the manuscript. AB provided assistance on imaging and quantification of data. MB provided assistance on immunohistochemistry. CY provided helpful advice and edited the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), the French National Research Agency (ANR-16-CE18-0010), and Fondation NRJ (Institut de France) to NS-Y. Funding sources had no involvement in study design, collection, analysis or interpretation of data, or decision to publish.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bettina Schmid (DZNE, Munich, Germany) for providing us with the Tg(HuC- hTau^{P301L}:DsRed) transgenic line, Francesca Peri (University of Zurich, Zurich, Switzerland) for providing us with the Tg(ApoE-eGFP) and Michael Redd (University College London, London, United Kingdom) for providing us with the rabbit anti-zebrafish L-plastin polyclonal antibody. We also thank the imaging facility IMAG'IC (Cochin Institute, Paris). We also thank Christiane Romain and Olivier Bar (INSERM UMR 1141) for their technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.01199/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alavi Naini, S. M., and Soussi-Yanicostas, N. (2015). Tau hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015:151979. doi: 10.1155/2015/151979
- Bemiller, S. M., McCray, T. J., Allan, K., Formica, S. V., Xu, G., Wilson, G., et al. (2017). TREM2 deficiency exacerbates tau pathology through dysregulated kinase signaling in a mouse model of tauopathy. *Mol. Neurodegener.* 12:74. doi: 10.1186/s13024-017-0216-6
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O. N., Cardona, A., Ransohoff, R. M., and Lamb, B. T. (2010). Regulation of Tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68, 19–31. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.023
- Brockhaus, J., Möller, T., and Kettenmann, H. (1996). Phagocytosing amoeboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 16, 81–90. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199601)16:1<81::AID-GLIA9>3.0.CO;2-E;
- Butovsky, O., and Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 622–635. doi: 10.1038/s41583-018-0057-5
- Cătălin, B., Stopper, L., Bălăceanu, T.-A., and Scheller, A. (2017). The *in situ* morphology of microglia is highly sensitive to the mode of tissue fixation. *J. Chem. Neuroanat.* 86, 59–66. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.08.007
- Eyo, U. B., and Dailey, M. E. (2013). Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 494–509. doi: 10.1007/s11481-013-9434-z
- Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetki, J. C. M., Sajti, E., et al. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science* 356:eaal3222. doi: 10.1126/science.aal3222
- Hanisch, U. K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155. doi: 10.1002/glia.10161
- Hanisch, U. K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., and Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472. doi: 10.1083/jcb.201709069
- He, Y., Yao, X., Taylor, N., Bai, Y., Lovenberg, T., and Bhattacharya, A. (2018). RNA sequencing analysis reveals quiescent microglia isolation methods from postnatal mouse brains and limitations of BV2 cells. *J. Neuroinflammation* 15:153. doi: 10.1186/s12974-018-1195-4
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L., Means, T. K., et al. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* 16, 1896–1905. doi: 10.1038/nn.3554
- Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., et al. (2015). Microglial and macrophage polarization - new prospects for brain repair. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 56–64. doi: 10.1038/nrneuro.2014.207
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H. H., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–704. doi: 10.1038/31508
- Kierdorf, K., and Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *J. Clin. Invest.* 127, 3201–3209. doi: 10.1172/JCI90602
- Laurent, C., Buée, L., and Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: what impact for Alzheimer's disease and tauopathies? *Biomed. J.* 41, 21–33. doi: 10.1016/j.bj.2018.01.003
- Leong, S. K., and Ling, E. A. (1992). Amoeboid and ramified microglia: their interrelationship and response to brain injury. *Glia* 6, 39–47. doi: 10.1002/glia.440060106
- Ling, E. -A., and Wong, W. -C. (1993). The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7, 9–18. doi: 10.1002/glia.440070105
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-cochran, O. N., Cardona, A., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., et al. (2015a). Loss of tau rescues inflammation-mediated neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 9:196. doi: 10.3389/fnins.2015.00196
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R. M., et al. (2015b). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* 138, 1738–1755. doi: 10.1093/brain/awv081
- Martini-Stoica, H., Cole, A. L., Swartzlander, D. B., Chen, F., Wan, Y.-W., Bajaj, L., et al. (2018). TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J. Exp. Med.* 215, 2355–2377. doi: 10.1084/JEM.20172158
- Naini, S. M. A., Yanicostas, C., Hassan-Abdi, R., Blondeel, S., Bennis, M., Weiss, R. J., et al. (2018). Surfen and oxalyl surfen decrease tau hyperphosphorylation and mitigate neuron deficits *in vivo* in a zebrafish model of tauopathy. *Transl. Neurodegener.* 7:6. doi: 10.1186/s40035-018-0111-2
- Nakajima, K., and Kohsaka, S. (2001). Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem.* 130, 169–75. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002969
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 308, 1314–1318. doi: 10.1126/science.1110647
- Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E. M., Berg, S., Hellberg, S., et al. (2009). A zebrafish model of tauopathy allows *in vivo* imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J. Clin. Invest.* 119, 1382–1395. doi: 10.1172/JCI37537
- Perea, J. R., Llorens-Martín, M., Ávila, J., and Bolós, M. (2018). The role of microglia in the spread of Tau: relevance for tauopathies. *Front. Cell. Neurosci.* 12:172. doi: 10.3389/fncel.2018.00172
- Perea, J. R., López, E., Díez-Ballesteros, J. C., Ávila, J., Hernández, F., and Bolós, M. (2019). Extracellular monomeric Tau is internalized by astrocytes. *Front. Neurosci.* 13:442. doi: 10.3389/fnins.2019.00442
- Peri, F., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion *in vivo*. *Cell* 133, 916–927. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.037
- Puverel, S., Nakatani, H., Parras, C., and Soussi-Yanicostas, N. (2009). Prokineticin receptor 2 expression identifies migrating neuroblasts and their subventricular zone transient-amplifying progenitors in adult mice. *J. Comp. Neurol.* 512, 232–242. doi: 10.1002/cne.21888
- Rhodes, J., Hagen, A., Hsu, K., Deng, M., Liu, T. X., Look, A. T., et al. (2005). Interplay of pu.1 and Gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev. Cell* 8, 97–108. doi: 10.1016/j.devcel.2004.11.014
- Rustenhoven, J., Smith, A. M., Smyth, L. C., Jansson, D., Scotter, E. L., Swanson, M. E. V., et al. (2018). PU.1 regulates Alzheimer's disease-associated genes in primary human microglia. *Mol. Neurodegener.* 13:44. doi: 10.1186/s13024-018-0277-1
- Shiau, C. E., Monk, K. R., Joo, W., and Talbot, W. S. (2013). An anti-inflammatory NOD-like receptor is required for microglia development. *Cell Rep.* 5, 1342–1352. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.004
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Gerber, Y. N., Ries, M., Sastre, M., Tolkovsky, A. M., and Spillantini, M. G. (2017). Astrocytes in mouse models of tauopathies acquire early deficits and lose neurosupportive functions. *Acta Neuropathol. Commun.* 5:89. doi: 10.1186/s40478-017-0478-9
- Spillantini, M. G., and Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12, 609–622. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70090-5
- Sun, W., Suzuki, K., Toptunov, D., Stoyanov, S., Yuzaki, M., Khiroug, L., et al. (2019). *In vivo* two-photon imaging of anesthesia-specific alterations in microglial surveillance and photodamage-directed motility in mouse cortex. *Front. Neurosci.* 13:421. doi: 10.3389/fnins.2019.00421
- Thameem Dheen, S., Kaur, C., and Ling, E.-A. (2007). Microglial Activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–1197. doi: 10.2174/092986707780597961

- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36, 209–217. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.007
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 5–21. doi: 10.1038/nrn.2015.1
- Zhao, X., Liao, Y., Morgan, S., Mathur, R., Feustel, P., Mazurkiewicz, J., et al. (2018). Noninflammatory changes of microglia are sufficient to cause epilepsy. *Cell Rep.* 22, 2080–2093. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.004
- Zhu, C., Herrmann, U. S., Falsig, J., Abakumova, I., Nuvolone, M., Schwarz, P., et al. (2016). A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J. Exp. Med.* 213, 1047–1059. doi: 10.1084/jem.20151000

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

Copyright © 2019 Hassan-Abdi, Brenet, Bennis, Yanicostas and Soussi-Yanicostas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article annexe 2. “A fast, simple, and affordable technique to measure oxygen consumption in living zebrafish embryos”

Julie Somkhit*, Roxane Loyant*, **Alexandre Brenet**, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Mathien Porceddu, Annie Borgne-Sanchez, & Nadia Soussi-Yanicostas

* : co-premier auteurs

Publié le 4 Mai 2020 dans le journal **Zebrafish** (IF : 1,845)
doi : 10.1089/zeb.2020.1878

Présentation de l'article

La respiration est un mécanisme complexe désignant tant les échanges gazeux avec l'extérieur, les apports de dioxygène et le relargage de dioxyde de carbone, que les mécanismes cellulaires liés à la consommation du dioxygène constituant notre source principale d'énergie. Les défauts de la respiration cellulaire sont au cœur de nombreuses maladies. C'est pourquoi l'étude de la consommation d'oxygène par les cellules et les organismes vivants peut nous apporter des informations très importantes sur leur état physiologique. Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer les capacités respiratoires des cellules ou des petits organismes, et notamment les automates du type Seahorse™. Cependant, même si cette technique permet de caractériser précisément, et à grande échelle, le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire de cellules en culture, elle n'est pas encore totalement optimisée, et reste surtout très onéreuse, pour les organismes vivants, comme les larves de poisson zèbre. C'est pourquoi nous avons développé une nouvelle approche plus simple et beaucoup moins chère qui permet de mesurer la consommation en dioxygène de plusieurs dizaines de larves de poisson zèbre simultanément. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une sonde dont la fluorescence est inhibée, de façon dose-dépendante et linéaire, par l'interaction avec des molécules de dioxygène. Dès lors, le simple enregistrement de l'intensité de fluorescence du milieu indique, en temps réel, la quantité de dioxygène présent dans le milieu et permet donc de déterminer sa consommation au cours du temps. De plus, la petite taille des larves de poisson zèbre nous permet de réaliser cet essai dans des plaques 96 puits, ce qui ouvre la possibilité à des criblages de molécules à moyen/haut débit.

Nous avons utilisé cette technique afin d'étudier la respiration des embryons exposés à un organophosphoré, le diisopropylfluorophosphate, ce qui nous a permis de montrer un défaut de la respiration des larves exposées à cet organophosphoré (résultats non publiés).

A Fast, Simple, and Affordable Technique to Measure Oxygen Consumption in Living Zebrafish Embryos

Julie Somkhit,^{1,*} Roxane Loyant,^{2,*} Alexandre Brenet,¹ Rahma Hassan-Abdi,¹ Constantin Yanicostas,¹ Mathieu Porceddu,² Annie Borgne-Sanchez,² and Nadia Soussi-Yanicostas¹

Abstract

In all animal species, oxygen consumption is a key process that is partially impaired in a large number of pathological situations and thus provides informative details on the physiopathology of the disease. In this study, we describe a simple and affordable method to precisely measure oxygen consumption in living zebrafish larvae using a spectrofluorometer and the MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay. In addition, we used zebrafish larvae treated with mitochondrial respiratory chain inhibitors, antimycin A or rotenone, to verify that our method enables precise and reliable measurements of oxygen consumption.

Keywords: respiration, zebrafish larvae, oxygen consumption

Introduction

RESPIRATION IS A KEY cellular function, which is altered in a great number of disorders and animal disease models, thus providing a meaningful window to interrogate the physiology of living cells and organisms.¹ Automated devices allowing precise measurement of both mitochondrial respiration (oxidative phosphorylation) and glycolysis have been developed in recent years, but their price and cost of usage restrain their use on a daily basis. To overcome this limitation, we describe here a simple and affordable method that allows precise measurement of oxygen consumption in living zebrafish larvae, using a simple spectrofluorometer and the MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay (Agilent), a quantitative test relying on a fluorescent probe, which is quenched in a dose-dependent manner by O₂ molecules (Fig. 1A).

Results

To assess the ability of this method to detect fine changes in O₂ consumption in living zebrafish larvae, we measured O₂ consumption of pools of seven 5 days post-fertilization wild-type individuals treated with either vehicle (1% dimethyl

¹NeuroDiderot, Inserm U1141, Université de Paris, Paris, France.

²Mitologics SAS, Faculté de Médecine, Créteil, France.

*These authors contributed equally to this work.

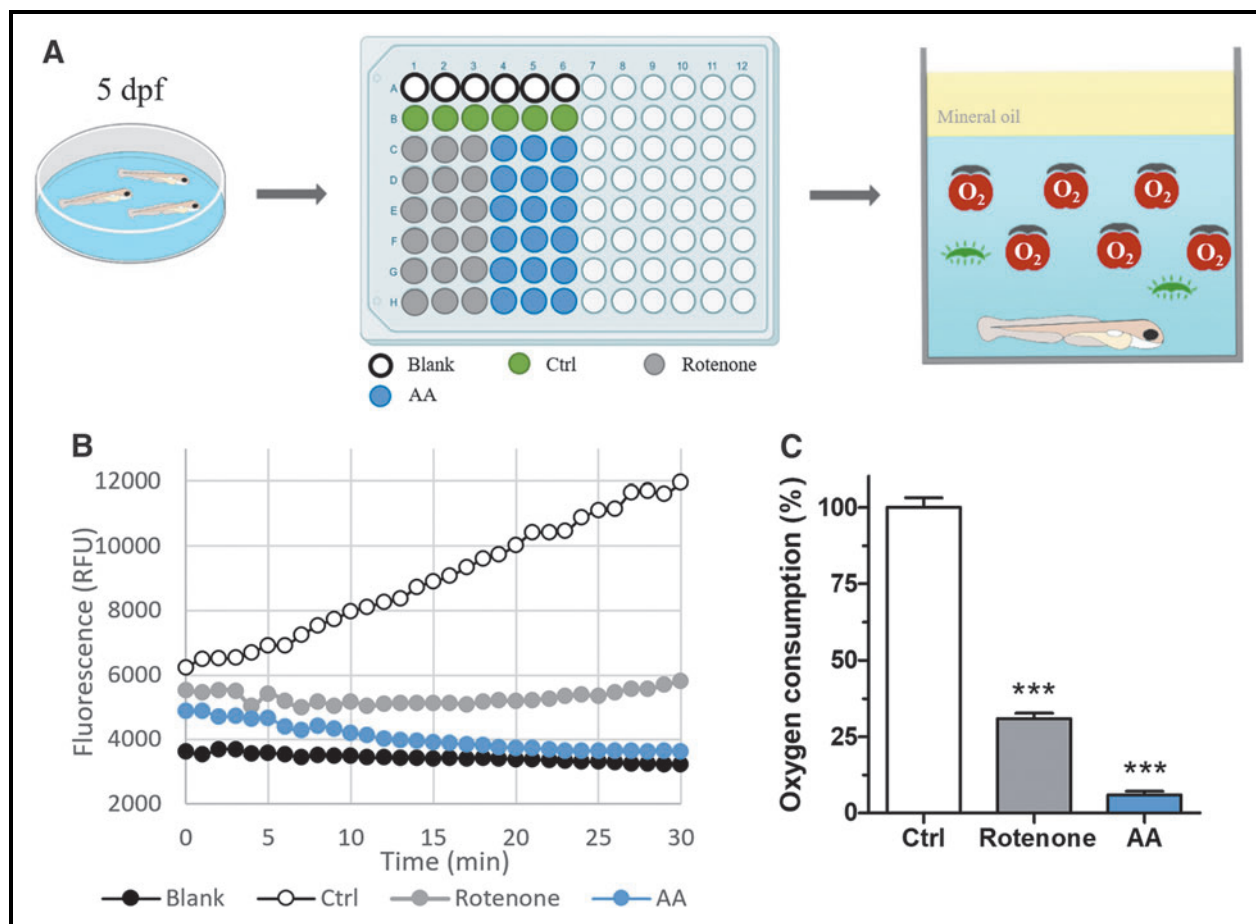


FIG. 1. Real-time measurement of oxygen consumption in 5 dpf zebrafish larvae. (A) Scheme of the experimental setup used to measure oxygen consumption *in vivo* in zebrafish larvae, treated or not with MRC inhibitors, with an example of a filled 96-well microplate. Pools of seven 5 dpf larvae treated with MRC inhibitors or untreated (control) were transferred to a 96-well microplate (Greiner Bio-One International) and then incubated in the presence of the MitoXpress Xtra probe, (Supplementary Data) a fluorescent molecule whose fluorescence is quenched in a dose-dependent manner by O₂ through direct molecular interactions, thus making fluorescence intensity inversely proportional to the amount of free O₂ dissolved in the medium. (B) Real-time measurement of the oxygen consumption in larvae exposed to MRC inhibitors or untreated, and blank (E3 medium without larva). (C) Quantification of the oxygen consumption of larvae exposed to either 2 μ M rotenone or 10 μ M AA. Whiskers represent the standard error of the mean. Rotenone ($n=36$), AA ($n=35$), control ($n=18$), and blank ($n=24$), one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test: *** $p < 0.0001$. AA, antimycin A; ANOVA, analysis of variance; dpf, days post-fertilization; MRC, mitochondrial respiratory chain.

sulfoxide [DMSO]), 2 μ M rotenone, a specific inhibitor of the mitochondrial respiratory chain (MRC) complex I,² or 10 μ M antimycin A (AA), a specific inhibitor of the MRC complex III (Fig. 1A).^{3,4} As previously reported, we found that 1% DMSO concentration had no effect on larval development.⁵

Results showed that oxygen consumption of larvae exposed to 2 μ M rotenone and 10 μ M AA was 31% and 6%, respectively, of that observed in non-treated controls (Fig. 1B, C, Supplementary Data), indicating that the method described allows reliable measurements of oxygen consumption. Thus, this simple and direct method can be used to measure respiration *in vivo* in zebrafish intoxication and disease models.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE18-0010 MITOXDRUGS).

Supplementary Material

Supplementary Data

References

1. Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem* 2019;294:5386–5395.
2. Lindahl PE, Öberg KE. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res* 1961;23:228–237.
3. Huang LS, Cobessi D, Tung EY, Berry EA. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial Bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 2005;351:573–597.
4. Rieske JS. Inhibitors of respiration at energy-coupling site 2 of the respiratory chain. *Pharmacol Ther* 1980;11:415–450.
5. Alavi Naini SM, Yanicostas C, Hassan-Abdi R, Blondeel S, Bennis M, Weiss RJ, *et al.* Surfen and oxalyl surfen decrease tau hyperphosphorylation and mitigate neuron deficits in vivo in a vertebrate model of tauopathy. *Transl Neurodegener* 2018;7:6.

Address correspondence to:

*Nadia Soussi-Yanicostas
NeuroDiderot, INSERM U1141
Hôpital Robert Debré
48 Boulevard Sérurier
Paris F-75019
France*

E-mail: nadia.soussi@inserm.fr

Article annexe 3. “Bixafen, a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, causes microcephaly and motor neuron axon defects during development”

Alexandre Brenet*, Rahma Hassan-Abdi*, & Nadia Soussi-Yanicostas

* : co-premier auteurs

Publié le 27 Octobre 2020 dans le journal **Chemosphere** (IF : 5,778)
doi : 10.1016/j.chemosphere.2020.128781

Présentation de l'article

Les intoxications aux pesticides sont un grave problème de santé dans le monde, tout particulièrement pour les nouveau-nés et les enfants, avec des millions de cas chaque année. La famille des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI), est le groupe de fongicides qui connaît la croissance la plus rapide. Ces molécules inhibent la SDH, un composant essentiel du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dès lors, son inhibition peut provoquer des défauts du métabolisme cellulaire, pouvant conduire jusqu'à la mort de la cellule. Il a récemment été montré que l'activité inhibitrice des SDHI n'est pas restreinte à la SDH des champignons, mais que ces molécules sont actives chez toutes les espèces qui possèdent des mitochondries, et notamment les êtres humains. Ainsi, en 2013, une expertise collective de l'INSERM a souligné que l'exposition professionnelle aux pesticides pouvait être associée à l'apparition de pathologies neurologiques, de troubles du développement cérébrales et de cancers, impliquant des mécanismes pas toujours clairement identifiés. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le poisson zèbre afin, notamment, d'étudier les conséquences d'une exposition prolongée aux SDHI sur le neurodéveloppement des embryons. Le bixafen constitue l'un des SDHI les plus largement utilisés dans l'agriculture moderne occidentale, c'est pourquoi nous l'avons sélectionné pour notre étude. Nos résultats montrent alors que le bixafen est une molécule toxique pour les embryons de poisson zèbre. En effet, il induit un retard de développement et des défauts morphologiques, dont la sévérité est proportionnelle à la concentration d'exposition. De plus, même une exposition précoce à de faibles concentrations, provoque une microcéphalie ainsi que des défauts de maturation des motoneurones, conduisant à des problèmes locomoteurs chez les larves. Dès lors, ce travail fournit de nouvelles indications sur la toxicité des inhibiteurs de la SDH qui devraient aider à prendre les précautions appropriées pour protéger les populations humaines, mais aussi la faune sauvage, contre les effets neurotoxiques de ces molécules.



Short Communication

Bixafen, a succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, causes microcephaly and motor neuron axon defects during development

Alexandre Brenet¹, Rahma Hassan-Abdi¹, Nadia Soussi-Yanicostas^{*}

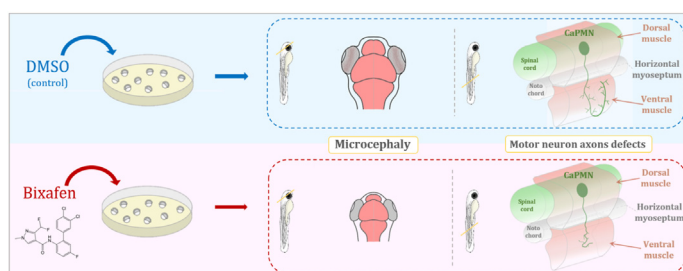
Université de Paris, NeuroDiderot, Inserm, F-75019, Paris, France



HIGHLIGHTS

- Zebrafish embryos exposed to the succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) bixafen show CNS development defects.
- Brain development is disturbed in embryos exposed to SDHI, bixafen, leading to microcephaly.
- Spinal cord axon outgrowth and branching are adversely affected in embryos exposed to SDHI bixafen.
- The developing CNS is vulnerable to bixafen exposure.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2020
 Received in revised form
 7 October 2020
 Accepted 25 October 2020
 Available online 27 October 2020

Handling Editor: A. Gies

Keywords:

Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs)
 Fungicide
 Zebrafish
 Neurodevelopment
In vivo imaging

ABSTRACT

Succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), the most widely used fungicides in agriculture today, act by blocking succinate dehydrogenase (SDH), an essential and evolutionarily conserved component of mitochondrial respiratory chain. Recent results showed that several SDHIs used as fungicides not only inhibit the SDH activity of target fungi but also block this activity in human cells in *in vitro* models, revealing a lack of specificity and thus a possible health risk for exposed organisms, including humans. Despite the frequent detection of SDHIs in the environment and on harvested products and their increasing use in modern agriculture, their potential toxic effects *in vivo*, especially on neurodevelopment, are still under-evaluated. Here we assessed the neurotoxicity of bixafen, one of the latest-generation SDHIs, which had never been tested during neurodevelopment. For this purpose, we used a well-known vertebrate model for toxicity testing, namely zebrafish transparent embryos, and live imaging using transgenic lines labelling the brain and spinal cord. Here we show that bixafen causes microcephaly and defects on motor neuron axon outgrowth and their branching during development. Our findings show that the central nervous system is highly sensitive to bixafen, thus demonstrating *in vivo* that bixafen is neurotoxic in vertebrates and causes neurodevelopmental defects. This work adds to our knowledge of the toxic effect of SDHIs on neurodevelopment and may help us take appropriate precautions to ensure protection against the neurotoxicity of these substances.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Bixafen, a methyl-pyrazole carboxamide, is a fungicide widely used on cereal and rapeseed crops. It was initially approved and marketed in 2011 by Bayer (Ravichandra 2018). Its high efficiency and rapid penetration resulted in a significant rise in usage in

* Corresponding author.

E-mail address: nadia.soussi@inserm.fr (N. Soussi-Yanicostas).

¹ Co-first authors.

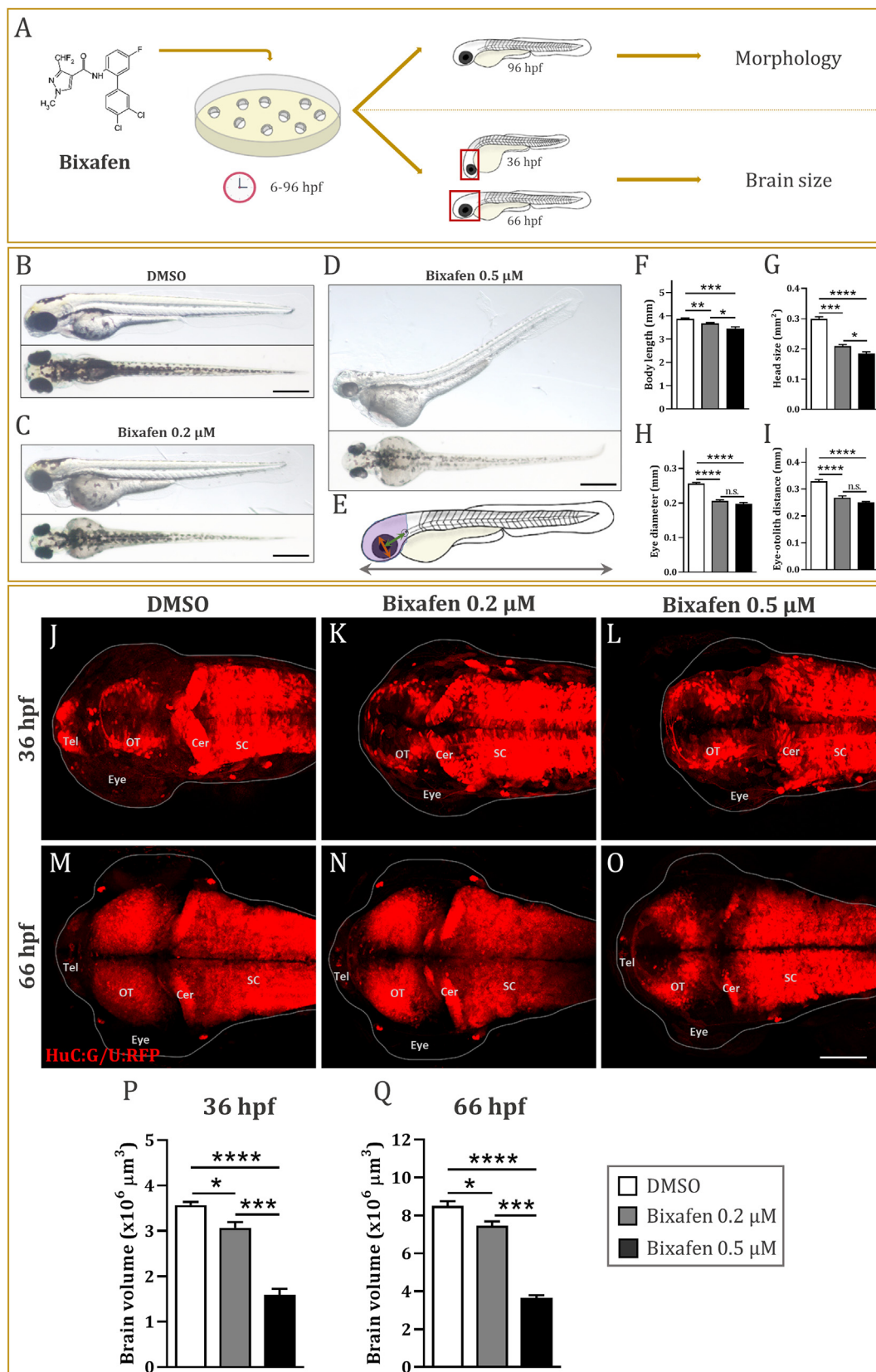


Fig. 1. Bixafen exposure causes microcephaly. (A) Experimental setup used to analyze the body morphological parameters and brain size of zebrafish embryos exposed to 0.2 or 0.5 μM bixafen, from 6 hpf onward up to 36 or 66 hpf (brain analysis), or 96 hpf (morphological analysis). (B–D) Lateral and dorsal views of 96 hpf larvae treated with 0.1% DMSO (B) or 0.2 μM (C) or 0.5 μM (D) bixafen. (E) Scheme depicting the different morphological parameters measured: body length (black double-arrow), head size (purple area), eye diameter (red double-arrow) and eye-otolith distance (green double-arrow). (F–I) Body length (F), head size (G), eye diameter (H) and eye-otolith distance (I), of 96 hpf larvae exposed to 0.1% DMSO (n = 14), or 0.2 μM (n = 15) or 0.5 μM (n = 12) bixafen. (J–O) Dorsal views of the brain of 36 (J–L) or 66 hpf transgenic Tg[huc:G/U:RFP] embryos (M–O),

Europe and the US. Currently, nearly 30 different products are sold on the French market alone that contain bixafen as sole active substance or mixed with other fungicides. Bixafen belongs to the succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) family, the fungicides most widely used in agriculture to fight a broad range of fungal diseases (Lalève et al., 2014; Zhang et al., 2019). Bixafen, which is derived from carboxin and categorized as a latest-generation SDHIs, acts through inhibition of mitochondrial respiration chain complex II, also known as succinate dehydrogenase (SDH). However, the inhibitory effect of SDHIs is not restricted to fungi: they also block the mitochondrial respiration chain in many other species, including human cells (Bénit et al., 2019). Additionally, the latest-generation SDHIs have been shown to also inhibit mitochondrial respiration complex III (Bénit et al., 2019), suggesting more critical effects of these new fungicides. SDH activity is essential for proper mitochondrial respiration and metabolism, and defects in its activity impair the cellular metabolome and functions (Bénit et al., 2014). Many human diseases are related to SDH deficiency, including neurodegenerative disorders, such as Leigh syndrome, an early-onset neurodegenerative disease characterized by developmental delay, ataxia and seizures (Birch-Machin et al., 2000; Bourgeron 2015; Van Coster et al., 2003; Finsterer 2008; Horváth et al., 2006; Parfait et al., 2000), and cancers, such as familial paraganglioma syndrome, infantile leukoencephalopathy, and neuroblastoma (Ghezzi et al., 2009; Martin et al., 2007; Perry et al., 2006; Ricketts et al., 2009; Stratakis and Carney 2009; Timmers et al., 2009). The Norwegian scientific committee for food safety (VKM) has assessed the health and environmental risk of Aviator Xpro EC225, a fungicide containing bixafen, and concluded that the effects of bixafen in animals should be considered relevant for humans (VKM Report 2014). Also, M44, a bixafen metabolite, which has the potential to contaminate groundwater, causes abnormalities in the rabbit foetus, suggesting that similar effects in humans cannot be excluded (VKM Report 2015). However, despite the increasing use of SDHIs in modern agriculture and their frequent detection in the environment and on harvested products (Abad-Fuentes et al., 2015; Añasco et al. 2010; Tanabe and Kawata 2009; Tsuda et al., 2009; Vu et al., 2016), the potential toxic effects of these substances, especially on neurodevelopment, have so far been poorly evaluated.

To fill this gap and assess the neurotoxicity of these latest-generation SDHI fungicides *in vivo*, we tested the potential toxic effect of bixafen on zebrafish embryos. We observed that embryos exposed to low or medium bixafen concentrations, LOAEL and LC30, developed a series of defects, including microcephaly and disorganized motor neuron axons and branches. This study demonstrated the toxicity of bixafen on CNS development and gives insight into the environmental risk of this SDHI on the nervous system in vertebrates.

2. Results

2.1. Toxicity of bixafen *in vivo* in zebrafish embryos

To assess the potential toxicity of bixafen, a SDHI belonging to the pyrazole group of fungicides, zebrafish embryos were exposed to increasing concentrations of bixafen ranging from 0.1 μM to 4 μM , from 6 h post-fertilization (hpf) onward up to 96 hpf (Supplementary Fig. 1A). As no differences in survival rates or

embryo morphology could be detected between the 0.1% DMSO and fish water control groups (data not shown), embryos incubated in 0.1% DMSO were used as controls. Exposure of zebrafish embryos to 0.5 μM bixafen and above induced gross morphological defects and significantly increased mortality, compared with that seen in controls (Supplementary Fig. 1). Moreover, we observed a dose-dependent effect, with increasing concentrations of bixafen inducing increased mortality rates and increased phenotypic defects in surviving embryos (Supplementary Fig. 1B₁-K).

Results indicated that the median lethal concentration of bixafen was 2.7 μM for wild-type zebrafish embryos (AB line) after 96 h of incubation, i.e. 96 hpf LC50, and closely similar values were observed with the two other zebrafish lines used in this study, the transgenic Tg[Olig2:eGFP] and Tg[elav13:Gal4/5xUAS:RFP] double transgenic line (Akerboom et al., 2012; Asakawa et al., 2008), hereafter referred to as Tg[HuC:G/U:RFP] (Supplementary Fig. 1K).

To investigate the potential toxicity of bixafen, and particularly the effect of this SDHI on the morphology of the brain and spinal cord, we chose 0.2 μM , the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL), and 0.5 μM , the 96 hpf LC30, two concentrations that induce mild and moderate phenotypic defects in 96 hpf embryos, respectively, except for small heart oedema in embryos exposed to 0.2 μM bixafen (Fig. 1C), and large heart oedema and curved tail in embryos exposed to 0.5 μM bixafen (Fig. 1D). We next carefully examined the morphological parameters of embryos exposed to 0.2 and 0.5 μM bixafen, namely body length, head size, eye diameter and eye-otolith distance. Results indicated that following exposure to either 0.2 or 0.5 μM bixafen, surviving embryos show reduced body length and eye diameter, and decreased head size and eye-otolith distance, compared with that observed in age-matched controls (Fig. 1E-I).

2.2. Brain defects in embryos exposed to bixafen

Because several investigations have reported that exposure to SDHIs may induce neurotoxicity (Wang et al., 2020; Yao et al., 2018), we took advantage of the Tg[HuC:G/U:RFP] transgenic line, in which all post-mitotic brain neurons are labelled by the fluorescent RFP protein, to precisely examine the morphology of the brain of 36 and 66 hpf embryos, following exposure to 0.2 and 0.5 μM bixafen. Live imaging of the brain of 36 and 66 hpf embryos, clearly indicated that exposure to both 0.2 and 0.5 μM bixafen, induced smaller brain size (Fig. 1J-O). Precise quantification of brain volumes (Imaris software, Bitplane), indicated that 36 hpf embryos exposed to 0.2 ($3.07 \pm 0.13 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) or 0.5 μM bixafen ($1.60 \pm 0.13 \times 10^6 \mu\text{m}^3$), displayed a significantly smaller brain compared with that seen in age-matched controls ($3.57 \pm 0.07 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) (Fig. 1P). Similarly, 66 hpf embryos exposed to 0.2 ($7.45 \pm 0.24 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) or 0.5 μM bixafen ($3.64 \pm 0.15 \times 10^6 \mu\text{m}^3$), also displayed small brains compared to age-matched controls ($8.51 \pm 0.25 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) (Fig. 1Q). Our data thus showed that exposure of zebrafish embryos to low-dose bixafen corresponding to LOAEL induced microcephaly, a phenotype exacerbated in individuals incubated in 0.5 μM bixafen.

2.3. Impaired mobility and spinal motor neuron axon outgrowth defects in embryos exposed to bixafen

The small size of the brain observed in embryos exposed to

treated with 0.1% DMSO (J, M), or 0.2 (K, N) or 0.5 μM bixafen (L, O), and showing the microcephaly of embryos exposed to bixafen low/medium doses. (P-Q) Measurements of brain volume of 36 (P) or 66 hpf (Q) embryos exposed to 0.1% DMSO ($n_{36\text{hpf}} = 8$; $n_{66\text{hpf}} = 5$), or 0.2 μM ($n_{36\text{hpf}} = 6$; $n_{66\text{hpf}} = 5$) or 0.5 μM bixafen ($n_{36\text{hpf}} = 8$; $n_{66\text{hpf}} = 4$), further illustrate the microcephaly of embryos exposed to bixafen at 96 hpf LC30 and LOAEL concentrations. ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; n.s., non-significant. Scale bar: (B-D) = 0.5 mm; (J-O) = 100 μm . Abbreviations: Tel, telencephalon; OT, optic tectum; Cer, cerebellum; SC, spinal cord.

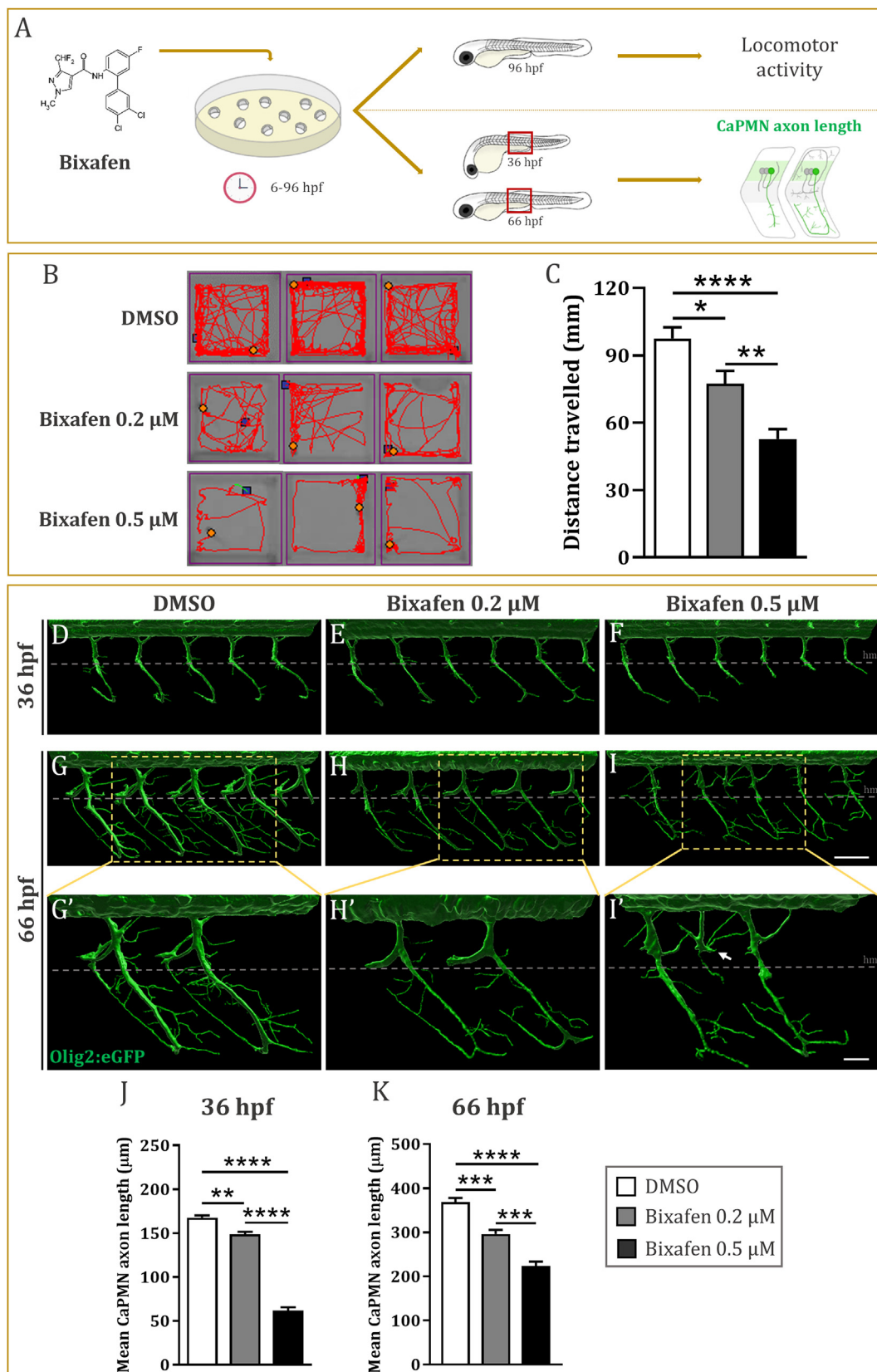


Fig. 2. Bixafen exposure induces motor deficit and motor neuron axon defects. (A) Experimental setup used to analyze the motor activity and patterning of caudal primary motor neuron (CaPMN) axons and branches, in zebrafish embryos exposed to 0.2 or 0.5 μ M bixafen, from 6 hpf onward up to 36 or 66 hpf (CaPMN axon morphology analysis), or 96 hpf (motor activity analysis). (B) Tracking plots illustrating the distance traveled by 96 hpf larvae treated with 0.1% DMSO (n = 85), or 0.2 (n = 72) or 0.5 μ M bixafen (n = 77), during a 25 min time period. (C) Quantification of the distance traveled by 96 hpf larvae exposed to 0.1% DMSO, or 0.2 or 0.5 μ M bixafen, during a 25 min time period. (D–I) Three-dimensional reconstruction of the organization of CaPMN axons and branches in 36 (D–F) or 66 hpf transgenic Tg[Olig2:eGFP] embryos (G–I'), exposed to 0.1% DMSO (D, G),

bixafen suggests a neurotoxic effect of this SDHI. To further investigate this issue and precisely assess the consequences of bixafen exposure on brain functioning, we studied and compared the locomotor activity of 0.2 and 0.5 μM bixafen-exposed and control embryos by measuring the distance traveled by these individuals over a 25 min period, using a ZebraBox tracking automate (View-Point®). Results indicated that embryos treated with 0.2 or 0.5 μM bixafen, displayed reduced mobility, as shown by the distance traveled over a 25 min period 77.3 ± 5.7 mm ($N = 4$, $n = 72$) and 52.7 ± 4.4 mm ($N = 4$, $n = 77$), respectively, compared to the distance traveled by controls (97.5 ± 4.9 mm, $N = 4$, $n = 85$) (Fig. 2B–C). Interestingly, the hypoactive behavior of embryos exposed to 0.2 μM bixafen was markedly worsened in those exposed to 0.5 μM , which were almost motionless.

Because bixafen exposure induces brain defects, we next determined whether the locomotor deficits observed in bixafen-exposed embryos was a consequence of defects in spinal cord motor neurons or their axons. To address this issue, we next analyzed the morphology of the spinal cord in 36 and 66 hpf embryos exposed to 0.2 and 0.5 μM bixafen, using the Tg[Olig2:eGFP] transgenic line (Shin et al., 2003), in which all motor neuron progenitors and their axons are labelled by eGFP. In particular, we focused on caudal primary motor neurons (CaPMN) and their axons, which are the most accessible.

Live imaging indicated that in 36 hpf controls, primary motor neuron axons extended ventrally to contact target muscles, forming a highly regular pattern (Fig. 2D). By contrast, motor neuron axons were markedly shortened in 36 hpf embryos treated with 0.2 bixafen (Fig. 2E), a phenotype markedly exacerbated in age-matched embryos exposed to 0.5 μM , bixafen (Fig. 2F). Three-dimensional reconstruction of CaPMN and their axons in 66 hpf control embryos revealed a highly stereotyped pattern with axons extending ventrally and branches projecting dorsally and laterally along the dorsal myoseptum to form a regular pattern in the space between the notochord and the myotome (Fig. 2G, G'). By contrast, following exposure to 0.2 μM bixafen, 66 hpf embryos displayed significantly shorter axons (Fig. 2H, H'), a phenotype significantly worsened in embryos exposed to 0.5 μM bixafen (Fig. 2I, I'), which also showed a marked disorganization of motor neuron axons and their branches, which extended in all directions.

Measurements of the length of CaPMN axons confirmed that bixafen exposure induced a marked shortening of these axons. Whereas in control embryos, the length of CaPMN axons was 167.9 ± 2.4 μm and 368.3 ± 9.3 μm , at 36 and 66 hpf, respectively, in embryos exposed to 0.2 μM , these values were reduced to 148.6 ± 3.1 μm at 36 hpf and 296.4 ± 9.0 μm at 66 hpf. Moreover, these defects were exacerbated in embryos exposed to 0.5 μM bixafen, with a mean CaPMN axon length of 61.8 ± 3.7 μm at 36 hpf and 223.7 ± 9.6 μm at 66 hpf (Fig. 2J and K). Thus, bixafen is neurotoxic and impairs the outgrowth and patterning of spinal motor axons and their branches.

3. Discussion

It is well-known that the developing CNS in vertebrates is especially sensitive and vulnerable to toxic chemicals, including phytosanitary agents, which are increasingly present in the environment. More specifically, in recent years, bixafen, a latest-generation succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI), has become

one of the most widely-used fungicides worldwide. However, the toxicity of bixafen has been under-appraised *in vivo* in vertebrate models so far, and especially its neurotoxicity for the developing CNS, an especially serious issue because of the complete lack of species-specificity of this latest-generation SDHI (Bénit et al., 2019). In the present work, we used zebrafish embryos as an *in vivo* model and demonstrate that bixafen exposure during embryogenesis induces a series of CNS defects.

In close agreement with previous investigations (Li et al., 2020; Wu et al., 2018), we first observed that zebrafish embryos exposed to bixafen showed clear developmental delays, as shown by morphological examination of embryos exposed to 0.5 μM bixafen and above, but also by a decrease in the eye-otolith distance and hypopigmentation, both observed in embryos incubated in 0.2 and 0.5 μM bixafen, corresponding to LOEL and 96 hpf LC30, respectively. Moreover, at the brain level, we observed that these two same concentrations induced brain defects and microcephaly, an observation in close agreement with the markedly reduced expression of the neuronal *neuroD* gene observed in zebrafish embryos treated with bixafen (Li et al., 2020). Microcephaly has been repeatedly observed in embryos exposed to many pesticides, including Maxim® XL (Svartz et al., 2016) and glyphosate (Paganelli et al., 2010), emphasizing the high vulnerability of the brain to these chemicals, and our study shows that SDHI bixafen also induces microcephaly, even at low doses.

In addition, using an automatic device that quantifies the speed and distance traveled by embryos, we also observed that 96 hpf embryos exposed to 0.2 or 0.5 M bixafen displayed reduced motility or almost complete paralysis, respectively. Quantification of the swimming behavior clearly showed motor deficits in embryos exposed to 0.2 μM bixafen which worsens in embryos exposed to 0.5 μM (Fig. 2C), that likely results from neuron abnormalities, not developmental delay. As it is known that the motor neuron is a major cell type regulating swimming behavior in zebrafish (Brustein et al., 2003), the motor defects seen in bixafen-exposed embryos prompted us to investigate the differentiation of motor neuron axons and branches in embryos exposed to 0.2 and 0.5 μM bixafen. In control embryos, motor neurons extend their axons in a highly stereotyped manner during development. In particular, caudal primary motor neuron (CaPMN) axons exit the spinal cord and extend toward the ventral muscle. Interestingly, in embryos exposed to bixafen, we observed a reduction in axon outgrowth and defects in their branches, even in those exposed to 0.2 μM bixafen corresponding to LOEL, indicating that the development of motor neuron axons is highly sensitive to bixafen. Although the toxic effects of bixafen on the CNS are probably due at least in part to developmental delay, the disorganization of motor neuron axons and branches clearly reveals a neurotoxicity of bixafen in zebrafish embryos.

Bixafen is a methyl-pyrazole, one of the SDHI fungicides used to manage plant diseases and inhibit the respiration of pathogenic fungi by blocking succinate complex II in the mitochondrial respiratory chain. SDH is an enzyme involved in both oxidative phosphorylation and the tricarboxylic acid cycle, two processes that generate energy. This enzyme has been shown to be irreplaceable in mitochondrial and cell metabolism and also to be highly conserved among all fungi, plants and animal species (Rehfus et al., 2016; Veloukas et al. 2013; Yamashita and Fraaije 2018). Any adverse change or inhibition of SDH activity can therefore lead to

0.2 (E, H) or 0.5 μM bixafen (F, I), showing the disorganization of CaPMN axons and branches, following exposure to 0.2 and, even more, 0.5 μM bixafen (white arrow). (G–I') Higher magnifications of the morphology of CaPMN axons and branches, in embryos exposed to 0.1% DMSO (G'), or 0.2 (H') or 0.5 μM bixafen (I'). (J, K) Quantification of the length of the primary CaPMN axons in 36 (J) and 66 hpf embryos (K), treated with DMSO ($n_{36\text{hpf}} = 13$; $n_{66\text{hpf}} = 7$), or 0.2 ($n_{36\text{hpf}} = 8$; $n_{66\text{hpf}} = 6$) or 0.5 μM bixafen ($n_{36\text{hpf}} = 22$; $n_{66\text{hpf}} = 9$), showing significantly shorter axons following exposure to bixafen at LOEL (0.2 μM) and, even more, 96 hpf LC30 (0.5 μM). ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. Scale bar: (D–I) = 100 μm ; (G'–I') = 50 μm .

many diseases, including those that have been linked to mitochondrial dysfunction (Birch-Machin et al., 2000; Bourgeron 2015; Van Coster et al., 2003; Finsterer 2008; Horváth et al., 2006; Parfait et al., 2000).

Several epidemiological studies published in the last two decades suggest harmful effects of pesticides on human health (Merhi et al., 2007; Weichenthal et al. 2010). Pesticide poisoning is a serious health problem that disproportionately affects infants and children (Rauh et al., 2012). Pesticides are known to cause millions of acute poisoning cases per year (Bertolote et al., 2006). Human exposure to pesticides can occur environmentally, through consumption in food and water (van den Berg et al., 2012). Bixafen is considered to be highly persistent in the environment (EFSA 2012). The half-lives of bixafen were 105 days in loam, 316 days in sandy loam, 1235 days in slit loam, and 82 days in water (EFSA 2012). A number of studies show that prenatal and early childhood exposure to some pesticides is associated with neurodevelopmental and cognitive disorders (Muñoz-Quezada et al., 2013; Ross et al., 2013). Aside from SDH inhibition, very little is known about the consequences of SDHI exposure on human health, and it is not known how bixafen affects the development of the CNS. As it is the case for other SDHIs, the toxic effect of bixafen observed in this study may be linked to the basic disruption of mitochondrial respiration chain complex II activity and subsequent accumulation of reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Results showed that a high concentration of bixafen induces reactive oxygen species production and subsequent DNA damage in human cell lines (Graillot et al., 2012). However, a recent study also demonstrated that bixafen exposure did not cause oxidative stress in zebrafish (Li et al., 2020), suggesting that induction of oxidative stress may not be the main mechanism underlying bixafen-induced neurotoxicity in zebrafish embryos. Thus the brain and spinal cord defects observed in embryos exposed to low-medium bixafen concentrations may be associated with the metabolic abnormalities reported in SDHI-exposed animals (Graillot et al., 2012; Qian et al., 2018; Wu et al., 2018; Yang et al., 2018).

In summary, our study provides new evidence of bixafen toxicity on neurodevelopment in a vertebrate model, and may help us take appropriate precautions to ensure protection against the neurotoxic effects of these substances.

4. Materials and methods

4.1. Ethics statement

All the animal experiments described in the present study were conducted at the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). They were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

4.2. Zebrafish lines and maintenance

Zebrafish were maintained at 26.5 °C in 14 h light and 10 h dark cycles. Embryos were collected by natural spawning, and 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (PTU) was added at 1 dpf (day post-fertilization) for embryos which were imaged *in vivo* to avoid pigmentation. The following transgenic lines were used: Tg[elav13:Gal4]^{zf349} (Akerboom et al., 2012), Tg[5xUAS:RFP]^{nkuasrfp1a} (Asakawa et al., 2008) and Tg[Olig2:eGFP] (Shin et al., 2003).

4.3. Chemicals

Dimethyl sulfoxide (DMSO) hybrid-max sterile (Sigma, D2650) was diluted in fish water to a final concentration of 0.1% (v/v). Bixafen, N-(3',4'-dichloro-5-fluorobiphenyl-2-yl)-3-(difluoromethyl)-1-methylpyrazole-4-carboxamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, code: 32581, CAS-No: 581809-46-3, Lot# BCBS9732V, purity >98%) was dissolved at a stock concentration of 400 mM in pure DMSO (100%) and conserved at -20 °C in aliquots until use.

4.4. Toxicity assay

Wild-type (AB line) and transgenic lines, Tg[HuC:G/U:RFP] or Tg [Olig2:eGFP] embryos were collected after spawning and washed twice with clean fish water. Six hpf embryos were selected, distributed randomly in 6-well microplates, with 30 embryos per well, following OECD TG 236 fish acute toxicity test (OECD 2013). Each well was filled with 6 mL of solution for each condition, with 12 conditions in all: fish water, 0.1% DMSO, 0.1 μM, 0.2 μM, 0.3 μM, 0.5 μM, 1 μM, 1.5 μM, 2 μM, 2.5 μM, 3 μM and 4 μM bixafen in 0.1% DMSO. Each day, dead embryos were selected under OECD guidelines (coagulation, no heartbeat or no somite) and discarded.

4.5. Locomotor activity

96 hpf larvae were distributed individually in a 96 well plate in 200 μl of fish water. The plate was then placed in the recording chamber of the zebrafish system for a 30 min habituation period before 25 min recording of larvae locomotion (Brenet et al., 2019). The results indicate the distance traveled by the larvae during the 25 min recording period.

4.6. Embryo imaging

36 hpf or 66 hpf embryos were anesthetized with 112 μg/mL 3-aminobenzoic acid ethyl ester (tricaine, Sigma), immobilized in 1% low melting-point agarose at the center of a 35 mm glass-bottomed dish (Corning), and covered with fish water containing 112 μg/mL tricaine. For embryo morphology analysis, bright field images were captured using a stereomicroscope (Zeiss). Live imaging of transgenic lines Tg[HuC:G/U:RFP] and Tg[Olig2:eGFP] was carried out using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a Leica 20×/0.75 multi-immersion objective.

4.7. Image analysis

Body length, head size, eye diameter and eye-otolith distance measurements were determined from bright field embryo images using the ruler tool in ImageJ. Brain volume and spinal neuron CaPMN axon length three-dimensional reconstructions and quantifications were performed using Imaris Measurement Pro (Bitplane Inc.).

4.8. Statistics

All statistics were obtained using Prism5 (GraphPad) and assessed by a one-way ANOVA tests followed by a Tukey post-tests. All data are represented as means ± SEM.

Author contributions

A.B. and R.H.A. performed the experiments and the analysis, designed the figures, and wrote the original draft. N.S.Y. supervised the project and wrote the manuscript.

Funding

This work was supported by Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), and the French National Research Agency (ANR-16-CE18-0010). Funding sources had no involvement in study design, collection, analysis or interpretation of data, or decision to publish.

Declaration of competing interest

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

Acknowledgments

We thank Christiane Romain (Inserm UMR 1141), Olivier Bar (Inserm UMR 1141) for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128781>.

References

- Abad-Fuentes, Antonio, Ceballos-Alcantarilla, Eric, Mercader, Josep V., Agulló, Consuelo, Abad-Somovilla, Antonio, Francesc, A., Esteve-Turrillas, 2015. "Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (14).
- Akerboom, J., Chen, T.W., Wardill, T.J., Tian, L., Marvin, J.S., Mutlu, S., Calderon, N.C., Esposti, F., Borghuis, B.G., Sun, X.R., Gordus, A., Orger, M.B., Portugues, R., Engert, F., Macklin, J.J., Filosa, A., Aggarwal, A., Kerr, R.A., Takagi, R., Kracun, S., Shigetomi, E., Khakh, B.S., Baier, H., Lagnado, L., Wang, S.S.H., Bargmann, C.I., Kimmel, B.E., Jayaraman, V., Svoboda, K., Kim, D.S., Schreiner, E.R., Looger, L.L., 2012. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* 32 (40), 13819–13840.
- Añaso, Nathaniel C., Koyama, Jiro, Uno, Seiichi, 2010. Pesticide residues in coastal waters affected by rice paddy effluents temporarily stored in a wastewater reservoir in southern Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (2), 352–360.
- Asakawa, Kazuhide, Suster, Maximiliano L., Mizusawa, Kanta, Nagayoshi, Saori, Kotani, Tomoya, Urasaki, Akihiro, Kishimoto, Yasuyuki, Hibi, Masahiko, Kawakami, Koichi, 2008. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (4), 1255–1260.
- Bénit, Paule, Kahn, Agathe, Chretien, Dominique, Bortoli, Sylvie, Huc, Laurence, Schiff, Manuel, Gimenez-Roqueplo, Anne Paule, Favier, Judith, Gressens, Pierre, Rak, Malgorzata, Rustin, Pierre, 2019. Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. *PLoS One* 14 (11).
- Bénit, Paule, Letouzé, Eric, Rak, Malgorzata, Aubry, Laetitia, Burnichon, Nelly, Favier, Judith, Gimenez-Roqueplo, Anne Paule, Rustin, Pierre, 2014. Undiscovered task for an old team: succinate, fumarate and other Krebs cycle acids in metabolic remodeling. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1837 (8), 1330–1337.
- van den Berg, F., Tiktak, A., Heuvelink, G.B.M., Burgers, S.L.G.E., Brus, D.J., de Vries, F., Stolte, J., Kroes, J.G., 2012. Propagation of uncertainties in soil and pesticide properties to pesticide leaching. *J. Environ. Qual.* 41 (1), 253–261.
- Bertolote, José M., Fleischmann, A., Eddleston, M., Gunnell, D., 2006. Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br. J. Psychiatry* 189 (SEP), 201–203.
- Birch-Machin, Mark A., Taylor, Robert W., Cochran, Bruce, Ackrell, Brian A.C., Turnbull, Douglass M., 2000. Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann. Neurol.* 48 (3), 330–335.
- Bourgeron, Thomas, 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 16 (9), 551–563.
- Brenet, Alexandre, Hassan-Abdi, Rahma, Somkhit, Julie, Yanicostas, Constantin, Soussi-Yanicostas, Nadia, 2019. Defective excitatory/inhibitory synaptic balance and increased neuron apoptosis in a zebrafish model of dravet syndrome. *Cells* 8 (10), 1199.
- Brustein, Edna, Louis Saint-Amant, Buss, Robert R., Chong, Mabel, McDearmid, Jonathan R., Drapeau, Pierre, 2003. "Steps during the development of the zebrafish locomotor network." In: *Journal of Physiology Paris*, vol. 97, pp. 77–86.
- Van Coster, Rudy, Seneca, S., Smet, J., Van Hecke, R., Gerlo, E., Devreese, B., Van Beeumen, J., Leroy, J.G., De Meirleir, L., Lissens, W., 2003. Homozygous Gly555Glu mutation in the nuclear-encoded 70 KDa flavoprotein gene causes instability of the respiratory chain complex II. *Am. J. Med. Genet.* 120A (1), 13–18.
- EFSA, 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bifenox. *EFSA J.* 10 (11), 2917.
- Finsterer, Josef, 2008. Cognitive decline as a manifestation of mitochondrial disorders (mitochondrial dementia). *J. Neurol. Sci.* 272 (1–2), 20–33.
- Ghezzi, Daniele, Goffrini, Paola, Uziel, Graziella, Horvath, Rita, Klopstock, Thomas, Lochmüller, Hanns, D'Adamo, Pio, Gasparini, Paolo, Strom, Tim M., Prokisch, Holger, Invernizzi, Federica, Ferrero, Ileana, Zeviani, Massimo, 2009. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.* 41 (6), 654–656.
- Graillot, Vanessa, Tomasetig, Pierre, Cravedi, Jean, Audebert, Marc, 2012. Evidence of the in vitro genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 748 (1–2), 8–16.
- Horvath, Rita, Abicht, A., Holinski-Feder, E., Laner, A., Gempel, K., Prokisch, H., Lochmüller, H., Klopstock, T., Jaksch, M., 2006. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 77 (1), 74–76.
- Lalève, Anaïs, Gamet, Stéphanie, Anne, Sophie Walker, Debieu, Danièle, Toquin, Valérie, Fillinger, Sabine, 2014. Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from botrytis cinerea highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ. Microbiol.* 16 (7), 2253–2266.
- Li, Wenhua, Yuan, Mingrui, Wu, Yaqing, Liu, Xuan, 2020. Bifenox exposure induces developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Res.* 189 (June), 109923.
- Martin, Caroline, Dubouchaud, Hervé, Mosoni, Laurent, Michel Chardigny, Jean, Oudot, Alexandra, Fontaine, Eric, Vergely, Catherine, Keriell, Christiane, Rochette, Luc, Lerverve, Xavier, Demaison, Luc, 2007. Abnormalities of mitochondrial functioning can partly explain the metabolic disorders encountered in sarcopenic gastrocnemius. *Aging Cell* 6 (2), 165–177.
- Merhi, M., Raynal, H., Cahuzac, E., Vinson, F., Cravedi, J.P., Gamet-Payastre, L., 2007. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 18 (10), 1209–1226.
- Muñoz-Quezada, Teresa, María, Lucero, Boris A., Barr, Dana B., Steenland, Kyle, Levy, Karen, Barry Ryan, P., Iglesias, Verónica, Alvarado, Sergio, Concha, Carlos, Rojas, Evelyn, Vega, Catalina, 2013. Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. *Neurotoxicology* 39, 158–168.
- OECD, 2013. "Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test." Guidelines for the Testing of Chemicals.
- Paganelli, Alejandra, Gnazzo, Victoria, Acosta, Helena, López, Silvia L., Carrasco, Andrés E., 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23 (10), 1586–1595.
- Parfait, Béatrice, Chretien, Dominique, Agnès, Rötig, Marsac, Cécile, Arnold, Munnich, Rustin, Pierre, 2000. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum. Genet.* 106 (2), 236–243.
- Perry, Colin G., Young, William J., McWhinney, Sarah R., Bei, Thalia, Stergiopoulos, Sotirios, Knudson, Ryan A., Ketterling, Rhett P., Eng, Charis, Stratakis, Constantine A., Aidan Carney, J., 2006. Functioning paraganglioma and gastrointestinal stromal tumor of the jejunum in three women: syndrome or coincidence. *Am. J. Surg. Pathol.* 30 (1), 42–49.
- Qian, Le, Cui, Feng, Yang, Yang, Liu, Yuan, Qi, Suzhen, Wang, Chengju, 2018. Mechanisms of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. *Sci. Total Environ.* 634, 478–487.
- Rauh, Virginia A., Perera, Frederica P., Megan, K. Horton, Whyatt, Robin M., Bansal, Ravi, Hao, Xuejun, Liu, Jun, Barr, Dana Boyd, Slotkin, Theodore A., Peterson, Bradley S., 2012. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (20), 7871–7876.
- Ravichandra, N.G., 2018. Agrochemicals in Plant Disease Management.
- Rehfs, Alexandra, Miessner, Simone, Achenbach, Janosch, Strobel, Dieter, Bryson, Rosie, Gerd Stammler, 2016. Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenopeziza teres* in Europe. *Pest Manag. Sci.* 72 (10), 1977–1988.
- Ricketts, Christopher, Zeegers, Maurice P., Jan, Lubinski, Maher, Eamonn R., 2009. Analysis of germline variants in CDH1, IGFBP3, MMP1, MMP3, STK15 and VEGF in familial and sporadic renal cell carcinoma. *PLoS One* 4 (6).
- Ross, Sarah Mac Kenzie, McManus, I.C., Harrison, Virginia, Mason, Oliver, 2013. Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. *Crit. Rev. Toxicol.* 43 (1), 21–44.
- Shin, Jimann, Park, Hae Chul, Topczewska, Jolanta M., Madwsley, David J., Appel, Bruce, 2003. Neural cell fate analysis in zebrafish using Olig2 BAC transgenics. *Methods Cell Sci.* 25 (1–2), 7–14.
- Stratakis, C.A., Carney, J.A., 2009. "The triad of paragangliomas, gastric stromal tumours and pulmonary chondromas (Carney triad), and the dyad of paragangliomas and gastric stromal sarcomas (Carney-Stratakis syndrome): molecular genetics and clinical implications." In: *Journal of Internal Medicine*, vol. 266, pp. 43–52 (J Intern Med).
- Svartz, Gabriela, Meijde, Fernando, Coll, Cristina Pérez, 2016. Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and

- gonadogenesis of the south American toad *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45, 1–7.
- Tanabe, Akiko, Kawata, Kuniaki, 2009. Daily variation of pesticides in surface water of a small river flowing through paddy field area. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82 (6), 705–710.
- Timmers, Henri J.L. M., Gimenez-Roqueplo, Anne Paule, Mannelli, Massimo, Pacak, Karel, 2009. Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr. Relat. Canc.* 16 (2), 391–400.
- Tsuda, T., Nakamura, T., Inoue, A., Tanaka, K., 2009. Pesticides in water, fish and shellfish from littoral area of lake biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82 (6), 716–721.
- Veloukas, Thomas, Markoglou, Anastasios N., Karaoglanidis, George S., 2013. Differential effect of SdhB gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 97 (1), 118–122.
- VKM Report, 2014. Health Risk Assessment of the Fungicide Aviator Xpro EC 225 - Vitenskapskomiteen for Mat Og Miljø, pp. 1–19.
- VKM Report, 2015. Risk Assessment of the Metabolite M44 of Bixafen, One of the Active Substances in Aviator Xpro EC 225 - Vitenskapskomiteen for Mat Og Miljø, pp. 1–20.
- Vu, Hung T., Keough, Michael J., Long, Sara M., Pettigrove, Vincent J., 2016. Effects of the boscalid fungicide Filan® on the marine amphipod *Allorchestes compressa* at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (5), 1130–1137.
- Wang, Honglei, Meng, Zhen, Liu, Fasheng, Zhou, Liqun, Su, Meile, Meng, Yunlong, Zhang, Shouhua, Liao, Xinjun, Cao, Zigang, Lu, Huiqiang, 2020. Characterization of boscalid-induced oxidative stress and neurodevelopmental toxicity in zebrafish embryos. *Chemosphere* 238.
- Weichenthal, Scott, Moase, Connie, Chan, Peter, 2010. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the agricultural health study cohort. *Environ. Health Perspect.* 118 (8), 1117–1125.
- Wu, Siyu, Lei, Lili, Liu, Mengting, Song, Yang, Lu, Shibo, Li, Dan, Shi, Huahong, Kathleen, M., Raley-Susman, He, Defu, 2018. Single and Mixture Toxicity of Strobilurin and SDHI Fungicides to *Xenopus Tropicalis* Embryos.
- Yamashita, Masao, Fraaije, Bart, 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field Populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag. Sci.* 74 (3), 672–681.
- Yang, Yang, Dong, Fengshou, Liu, Xingang, Xu, Jun, Wu, Xiaohu, Qi, Suzhen, Liu, Wenxian, Zheng, Yongquan, 2018. Thifluzamide affects lipid metabolism in zebrafish (*Danio reio*). *Sci. Total Environ.* 633, 1227–1236.
- Yao, Hongzhou, Yu, Jianping, Zhou, Ying, Xiang, Qingqing, Xu, Chao, 2018. The Embryonic Developmental Effect of Sedaxane on Zebrafish (*Danio Rerio*).
- Zhang, A., Yue, Ying, Yang, Y., Yang, Jian, Tao, Ke, Jin, Hong, Hou, Taiping, 2019. Discovery of N-(4-Fluoro-2-(Phenylamino)Phenyl)-Pyrazole-4-Carboxamides as potential succinate dehydrogenase inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol.* 158, 175–184.

BIBLIOGRAPHIE

- Afrikanova, Tatiana, Ann Sophie K. Serruys, Olivia E. M. Buenafe, Ralph Clinckers, Ilse Smolders, Peter A. M. de Witte, Alexander D. Crawford, and Camila V. Esguerra. 2013. "Validation of the Zebrafish Pentylene-tetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs." *PLoS ONE* 8(1).
- Ahrens, Misha B., Michael B. Orger, Drew N. Robson, Jennifer M. Li, and Philipp J. Keller. 2013. "Whole-Brain Functional Imaging at Cellular Resolution Using Light-Sheet Microscopy." *Nature Methods* 10(5):413–20.
- Akerboom, Jasper, Tsai Wen Chen, Trevor J. Wardill, Lin Tian, Jonathan S. Marvin, Sevinç Mutlu, Nicole Carreras Calderón, Federico Esposti, Bart G. Borghuis, Xiaonan Richard Sun, Andrew Gordus, Michael B. Orger, Ruben Portugues, Florian Engert, John J. Macklin, Alessandro Filosa, Aman Aggarwal, Rex A. Kerr, Ryousuke Takagi, Sebastian Kracun, Eiji Shigetomi, Baljit S. Khakh, Herwig Baier, Leon Lagnado, Samuel S. H. Wang, Cornelia I. Bargmann, Bruce E. Kimmel, Vivek Jayaraman, Karel Svoboda, Douglas S. Kim, Eric R. Schreiter, and Loren L. Looger. 2012. "Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging." *Journal of Neuroscience* 32(40):13819–40.
- Aldridge, W. N. 1981. "Organophosphorus Compounds: Molecular Basis for Their Biological Properties." *Science Progress* 67(265):131–47.
- Alfaro, Juan M., Jorge Ripoll-Gómez, and Javier S. Burgos. 2011. "Kainate Administered to Adult Zebrafish Causes Seizures Similar to Those in Rodent Models." *European Journal of Neuroscience* 33(7):1252–55.
- El Ali, Ayman and Serge Rivest. 2016. "Microglia Ontology and Signaling." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4(JUN):72.
- Andoh, Megumi, Yuji Ikegaya, and Ryuta Koyama. 2019. "Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy." *Journal of Clinical Medicine* 8(12):2170.
- Anon. 1989. "Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes: Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy." *Epilepsia* 30(4):389–99.
- Anwar, Arsalan, Sidra Saleem, Urvish K. Patel, Kogulavadanan Arumaithurai, and Preeti Malik. 2019. "Dravet Syndrome: An Overview." *Cureus* 11(6).
- Aronica, E., K. Boer, E. A. van Vliet, S. Redeker, J. C. Baayen, W. G. M. Spliet, P. C. van Rijen, D. Troost, F. H. Lopes da Silva, W. J. Wadman, and J. A. Gorter. 2007. "Complement Activation in Experimental and Human Temporal Lobe Epilepsy." *Neurobiology of Disease* 26(3):497–511.
- Aronica, Eleonora and Peter B. Crino. 2011. "Inflammation in Epilepsy: Clinical Observations." *Epilepsia* 52(SUPPL. 3):26–32.
- Atale, N., S. Gupta, U. C. S. Yadav, and V. Rani. 2014. "Cell-Death Assessment by Fluorescent and Nonfluorescent Cytosolic and Nuclear Staining Techniques." *Journal of Microscopy* 255(1):7–19.
- Augusto-Oliveira, Marcus, Gabriela P. Arrifano, Amanda Lopes-Araújo, Leticia Santos-Sacramento, Priscila Y. Takeda, Daniel C. Anthony, João O. Malva, and Maria Elena Crespo-Lopez. 2019. "What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain?" *Cells* 8(10).
- Auvin, Stéphane, Mohamed Jeljeli, Béatrice Desnous, Nadia Soussi-Yanicostas, Pascal Dournaud, and Ghislaine Sterkers. 2018. "Altered Vaccine-Induced Immunity in Children with Dravet Syndrome." *Epilepsia* 59(4):e45–50.
- Auvin, Stéphane, Andrey Mazarati, Don Shin, and Raman Sankar. 2010. "Inflammation Enhances

- Epileptogenesis in the Developing Rat Brain." *Neurobiology of Disease* 40(1):303–10.
- Auvin, Stéphane, Don Shin, Andrey Mazarati, Jo Anne Nakagawa, Justin Miyamoto, and Raman Sankar. 2007. "Inflammation Exacerbates Seizure-Induced Injury in the Immature Brain." Pp. 27–34 in *Epilepsia*. Vol. 48.
- Azevedo Kauppila, Linda, Isabel Amorim, Carla Bentes, and Ana Rita Peralta. 2018. *Trazodone: A New Antiepileptic Drug for Dravet Syndrome?* Vol. 5. Georg Thieme Verlag.
- Azlan, Nadiyah Syafiqah Mohd, Sze Yee Wee, Nur Afifah Hanun Ismail, Hanisah Mohmad Nasir, and Ahmad Zaharin Aris. 2020. "Organophosphorus Pesticide Multiresidues in Commercialized Asian Rice." *Environmental Toxicology and Chemistry* 39(10):1908–17.
- Badimon, Ana, Hayley J. Strasburger, Pinar Ayata, Xinhong Chen, Aditya Nair, Ako Ikegami, Philip Hwang, Andrew T. Chan, Steven M. Graves, Joseph O. Uweru, Carola Ledderose, Munir Gunes Kutlu, Michael A. Wheeler, Anat Kahan, Masago Ishikawa, Ying Chih Wang, Yong Hwee E. Loh, Jean X. Jiang, D. James Surmeier, Simon C. Robson, Wolfgang G. Junger, Robert Sebra, Erin S. Calipari, Paul J. Kenny, Ukpong B. Eyo, Marco Colonna, Francisco J. Quintana, Hiroaki Wake, Viviana Gradinaru, and Anne Schaefer. 2020. "Negative Feedback Control of Neuronal Activity by Microglia." *Nature* 586(7829):417–23.
- Bambino, Kathryn and Jaime Chu. 2017. "Zebrafish in Toxicology and Environmental Health." Pp. 331–67 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 124. Academic Press Inc.
- Baraban, S. C., M. R. Taylor, P. A. Castro, and H. Baier. 2005. "Pentylentetrazole Induced Changes in Zebrafish Behavior, Neural Activity and c-Fos Expression." *Neuroscience* 131(3):759–68.
- Baraban, Scott C., Matthew T. Dinday, Peter A. Castro, Sally Chege, Stephan Guyenet, and Michael R. Taylor. 2007. "A Large-Scale Mutagenesis Screen to Identify Seizure-Resistant Zebrafish." *Epilepsia* 48(6):1151–57.
- Baraban, Scott C., Matthew T. Dinday, and Gabriela A. Hortopan. 2013. "Drug Screening in Scn1a Zebrafish Mutant Identifies Clemizole as a Potential Dravet Syndrome Treatment." *Nature Communications* 4:2410.
- Baraban, Scott C., Matthew T. Dinday, and Gabriela A. Hortopan. 2013. "Drug Screening in Scn1a Zebrafish Mutant Identifies Clemizole as a Potential Dravet Syndrome Treatment." *Nature Communications* 4(1):2410.
- Barker-Haliski, Melissa and H. Steve White. 2015. "Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(8):1–15.
- von Bartheld, Christopher S., Jami Bahney, and Suzanaerculano-Houzel. 2016. "The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting." *Journal of Comparative Neurology* 524(18):3865–95.
- Baxendale, Sarah, Freek van Eeden, and Robert Wilkinson. 2017. "The Power of Zebrafish in Personalised Medicine." Pp. 179–97 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 1007. Springer New York LLC.
- Baxendale, Sarah, Celia J. Holdsworth, Paola L. Meza Santoscoy, Michael R. M. Harrison, James Fox, Caroline A. Parkin, Philip W. Ingham, and Vincent T. Cunliffe. 2012. "Identification of Compounds with Anti-Convulsant Properties in a Zebrafish Model of Epileptic Seizures." *DMM Disease Models and Mechanisms* 5(6):773–84.
- Bayat, Allan, Helle Hjalgrim, and Rikke S. Møller. 2015. "The Incidence of SCN1A-Related Dravet Syndrome in Denmark Is 1:22,000: A Population-Based Study from 2004 to 2009." *Epilepsia* 56(4):e36–39.
- Benz, Alexander Philipp, Jerome Niquet, Claude Wasterlain, and Abdelhaq Rami. 2014. "Status Epilepticus in the Immature Rodent Brain Alters the Dynamics of Autophagy." *Current Neurovascular Research* 11(2):125–35.

- Błaszczuk, Barbara and Stanisław J. Czuczwar. 2016. "Epilepsy Coexisting with Depression." *Pharmacological Reports* 68(5):1084–92.
- Boer, K., F. Jansen, M. Nellist, S. Redeker, A. M. W. van den Ouweland, W. G. M. Spliet, O. van Nieuwenhuizen, D. Troost, P. B. Crino, and E. Aronica. 2008. "Inflammatory Processes in Cortical Tubers and Subependymal Giant Cell Tumors of Tuberous Sclerosis Complex." *Epilepsy Research* 78(1):7–21.
- Bonansco, Christian and Marco Fuenzalida. 2016. "Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain." *Neural Plasticity* 2016.
- Bosco, Dale B., Dai Shi Tian, and Long Jun Wu. 2020. "Neuroimmune Interaction in Seizures and Epilepsy: Focusing on Monocyte Infiltration." *FEBS Journal* 287(22):4822–37.
- Boulay, Anne Cécile, Noémie Mazaré, Bruno Saubaméa, and Martine Cohen-Salmon. 2019. "Preparing the Astrocyte Perivascular Endfeet Transcriptome to Investigate Astrocyte Molecular Regulations at the Brain–Vascular Interface." Pp. 105–16 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1938. Humana Press Inc.
- Boullenger, Anne Isabelle. 2016. "The History of Myelin." *Experimental Neurology* 283(Pt B):431–45.
- Brenet, Alexandre, Rahma Hassan-Abdi, Julie Somkhit, Constantin Yanicostas, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2019. "Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome." *Cells* 8(10):1199.
- Brenet, Alexandre, Julie Somkhit, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Christiane Romain, Olivier Bar, Alexandre Igert, Dominique Saurat, Nicolas Taudon, Gregory Dal-Bo, Florian Nachon, Nina Dupuis, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2020. "Organophosphorus Diisopropylfluorophosphate (DFP) Intoxication in Zebrafish Larvae Causes Behavioral Defects, Neuronal Hyperexcitation and Neuronal Death." *Scientific Reports*.
- Brocal, Isabel, Richard J. White, Christopher M. Dooley, Samantha N. Carruthers, Richard Clark, Amanda Hall, Elisabeth M. Busch-Nentwich, Derek L. Stemple, and Ross N. W. Kettleborough. 2016. "Efficient Identification of CRISPR/Cas9-Induced Insertions/Deletions by Direct Germline Screening in Zebrafish." *BMC Genomics* 17(1).
- Brösamle, Christian and Marnie E. Halpern. 2002. "Characterization of Myelination in the Developing Zebrafish." *GLIA* 39(1):47–57.
- Brown, David A. 2019. "Acetylcholine and Cholinergic Receptors." *Brain and Neuroscience Advances* 3:239821281882050.
- Buenafe, Olivia Erin, Adriana Orellana-Paucar, Jan Maes, Hao Huang, Xuhui Ying, Wim De Borggraeve, Alexander D. Crawford, Walter Luyten, Camila V. Esguerra, and Peter De Witte. 2013. "Tanshinone IIA Exhibits Anticonvulsant Activity in Zebrafish and Mouse Seizure Models." *ACS Chemical Neuroscience* 4(11):1479–87.
- Burrows, D. R. W., Samarut, J. Liu, S. C. Baraban, M. P. Richardson, M. P. Meyer, and R. E. Rosch. 2020. "Imaging Epilepsy in Larval Zebrafish." *European Journal of Paediatric Neurology* 24:70–80.
- de Calbiac, Hortense, Adriana Dabacan, Elise Marsan, Hervé Tostivint, Gabrielle Devienne, Saeko Ishida, Eric Leguern, Stéphanie Baulac, Raul C. Muresan, Edor Kabashi, and Sorana Ciura. 2018. "Depdc5 Knockdown Causes MTOR-Dependent Motor Hyperactivity in Zebrafish." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 5(5):510–23.
- Cassar, Steven, Isaac Adatto, Jennifer L. Freeman, Joshua T. Gamse, Iñaki Iturria, Christian Lawrence, Arantza Muriana, Randall T. Peterson, Steven Van Cruchten, and Leonard I. Zon. 2020. "Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology." *Chemical Research in Toxicology*

- 33(1):95–118.
- Catterall, William A. 2000. "From Ionic Currents to Molecular Mechanisms : The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels." *Neuron* 26:13–25.
- Catterall, William A. 2012. "Voltage-Gated Sodium Channels at 60: Structure, Function and Pathophysiology." *The Journal of Physiology* 590(11):2577–89.
- Catterall, William A., Franck Kalume, and John C. Oakley. 2010. "NaV1.1 Channels and Epilepsy." *The Journal of Physiology* 588(Pt 11):1849–59.
- Ceulemans, Bertien, Marc Boel, Katrien Leyssens, Carolin Van Rossem, Pieter Neels, Philippe G. Jorens, and Lieven Lagae. 2012. "Successful Use of Fenfluramine as an Add-on Treatment for Dravet Syndrome." *Epilepsia* 53(7):1131–39.
- Challal, Soura, Olivia E. M. Buenafe, Emerson F. Queiroz, Snezana Maljevic, Laurence Marcourt, Merle Bock, Werner Kloeti, Fabian M. Dayrit, Alan L. Harvey, Holger Lerche, Camila V. Esguerra, Peter A. M. De Witte, Jean Luc Wolfender, and Alexander D. Crawford. 2014. "Zebrafish Bioassay-Guided Microfractionation Identifies Anticonvulsant Steroid Glycosides from the Philippine Medicinal Plant *Solanum Torvum*." *ACS Chemical Neuroscience* 5(10):993–1004.
- Cherry, Jonathan D., John A. Olschowka, and M. K. O'Banion. 2014. "Neuroinflammation and M2 Microglia: The Good, the Bad, and the Inflamed." *Journal of Neuroinflammation* 11:98.
- Chiron, Catherine. 2019. "Stiripentol for the Treatment of Seizures Associated with Dravet Syndrome." *Expert Review of Neurotherapeutics* 19(4):301–10.
- Claes, Lieve, Jurgen Del-Favero, Bertien Ceulemans, Lieven Lagae, Christine Van Broeckhoven, and Peter De Jonghe. 2001. "De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene *SCN1A* Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy." *Am. J. Hum. Genet* 68:1327–32.
- Commission Européenne. 2012. *2012/707/UE: Décision d'exécution de La Commission Du 14 Novembre 2012 Établissant Un Format Commun Pour La Transmission Des Informations Conformément à La Directive 2010/63/UE Du Parlement Européen et Du Conseil Relative à La Protection Des Animaux*. Publications Office of the European Union.
- Cope, David W., Giuseppe Di Giovanni, Sarah J. Fyson, Gergely Orbán, Adam C. Errington, Magor L. Lrincz, Timothy M. Gould, David A. Carter, and Vincenzo Crunelli. 2009. "Enhanced Tonic GABA A Inhibition in Typical Absence Epilepsy." *Nature Medicine* 15(12):1392–98.
- Costanzi, Stefano, John Hanson Machado, and Moriah Mitchell. 2018. "Nerve Agents: What They Are, How They Work, How to Counter Them." *ACS Chemical Neuroscience* 9(5):873–85.
- Crespel, Arielle, Philippe Coubes, Marie Claude Rousset, Corinne Brana, Alain Rougier, Gérard Rondouin, Joël Bockaert, Michel Baldy-Moulinier, and Mireille Lerner-Natoli. 2002. "Inflammatory Reactions in Human Medial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis." *Brain Research* 952(2):159–69.
- Davalos, Dimitrios, Jaime Grutzendler, Guang Yang, Jiyun V. Kim, Yi Zuo, Steffen Jung, Dan R. Littman, Michael L. Dustin, and Wen Biao Gan. 2005. "ATP Mediates Rapid Microglial Response to Local Brain Injury in Vivo." *Nature Neuroscience* 8(6):752–58.
- Devinsky, Orrin, J. Helen Cross, Linda Laux, Eric Marsh, Ian Miller, Rima Nababout, Ingrid E. Scheffer, Elizabeth A. Thiele, and Stephen Wright. 2017. "Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome." *New England Journal of Medicine* 376(21):2011–20.
- Devinsky, Orrin, La Toya King, Judith Bluvstein, and Daniel Friedman. 2021. "Ataluren for Drug-Resistant Epilepsy in Nonsense Variant-Mediated Dravet Syndrome and *CDKL5* Deficiency Disorder." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 8(3):639–44.

- Devinsky, Orrin, Anup D. Patel, Elizabeth A. Thiele, Matthew H. Wong, Richard Appleton, Cynthia L. Harden, Sam Greenwood, Gilmour Morrison, and Kenneth Sommerville. 2018. "Randomized, Dose-Ranging Safety Trial of Cannabidiol in Dravet Syndrome." *Neurology* 90(14):e1204–11.
- Dibué-Adjei, Maxine, Igor Fischer, Hans Jakob Steiger, and Marcel Alexander Kamp. 2017. "Efficacy of Adjunctive Vagus Nerve Stimulation in Patients with Dravet Syndrome: A Meta-Analysis of 68 Patients." *Seizure* 50:147–52.
- Dravet, Charlotte. 1978. "Les Épilepsies Graves de l'enfant." *Vie Med* (8):543–48.
- Dravet, Charlotte. 2011. "The Core Dravet Syndrome Phenotype." *Epilepsia* 52(SUPPL. 2):3–9.
- Du, Xu fei, Bing Xu, Yu Zhang, Min jia Chen, and Jiu lin Du. 2018. "A Transgenic Zebrafish Model for in Vivo Long-Term Imaging of Retinotectal Synaptogenesis." *Scientific Reports* 8(1).
- Dubbelaar, Marissa L., Laura Kracht, Bart J. L. Eggen, and Erik W. G. M. Boddeke. 2018. "The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes." *Frontiers in Immunology* 9:1753.
- Dupuis, Nina and Stéphane Auvin. 2015. "Inflammation and Epilepsy in the Developing Brain: Clinical and Experimental Evidence." *CNS Neuroscience & Therapeutics* 21(2):141–51.
- Dwivedi, Shubham, Raghavender Medishetti, Rita Rani, Aarti Sevilimedu, Pushkar Kulkarni, and Perumal Yogeewari. 2019. "Larval Zebrafish Model for Studying the Effects of Valproic Acid on Neurodevelopment: An Approach towards Modeling Autism." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 95:56–65.
- Eddleston, Michael, Nick A. Buckley, Peter Eyer, and Andrew H. Dawson. 2008. "Management of Acute Organophosphorus Pesticide Poisoning." *The Lancet* 371(9612):597–607.
- Egan, Rupert J., Carisa L. Bergner, Peter C. Hart, Jonathan M. Cachat, Peter R. Canavello, Marco F. Elegante, Salem I. Elkhayat, Brett K. Bartels, Anna K. Tien, David H. Tien, Sopan Mohnot, Esther Beeson, Eric Glasgow, Hakima Amri, Zofia Zukowska, and Allan V. Kalueff. 2009. "Understanding Behavioral and Physiological Phenotypes of Stress and Anxiety in Zebrafish." *Behavioural Brain Research* 205(1):38–44.
- Ehrich, Marion. 2005. "Organophosphates." Pp. 308–11 in *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier.
- Ellett, Felix, Luke Pase, John W. Hayman, Alex Andrianopoulos, and Graham J. Lieschke. 2011. "Mpeg1 Promoter Transgenes Direct Macrophage-Lineage Expression in Zebrafish." *Blood* 117(4):e49.
- Enderlin, Julie, Alexandre Igert, Stéphane Auvin, Florian Nachon, Grégory Dal Bo, and Nina Dupuis. 2020. "Characterization of Organophosphate-induced Brain Injuries in a Convulsive Mouse Model of Diisopropylfluorophosphate Exposure." *Epilepsia* 61(6):e54–59.
- Engeszer, Raymond E., Larissa B. Patterson, Andrew A. Rao, and David M. Parichy. 2007. "Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field." *Zebrafish* 4(1):21–40.
- Eyo, Ukpong B., Jiyun Peng, Przemyslaw Swiatkowski, Aparna Mukherjee, Ashley Bispo, and Long Jun Wu. 2014. "Neuronal Hyperactivity Recruits Microglial Processes via Neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y12 Receptors after Status Epilepticus." *Journal of Neuroscience* 34(32):10528–40.
- Fabene, Paolo F., Graciela Navarro Mora, Marianna Martinello, Barbara Rossi, Flavia Merigo, Linda Ottoboni, Simona Bach, Stefano Angiari, Donatella Benati, Asmaa Chakir, Lara Zanetti, Federica Schio, Antonio Osculati, Pasquina Marzola, Elena Nicolato, Jonathon W. Homeister, Lijun Xia, John B. Lowe, Rodger P. McEver, Francesco Osculati, Andrea Sbarbati, Eugene C. Butcher, and Gabriela Constantin. 2008. "A Role for Leukocyte-Endothelial Adhesion Mechanisms in Epilepsy." *Nature Medicine* 14(12):1377–83.

- Fan, Xue and Yves Agid. 2018. "At the Origin of the History of Glia." *Neuroscience* 385:255–71.
- Ferrero, Giuliano, Christopher B. Mahony, Eléonore Dupuis, Laurent Yvernogeu, Elodie Di Ruggiero, Magali Misericchi, Marianne Caron, Catherine Robin, David Traver, Julien Y. Bertrand, and Valérie Wittamer. 2018. "Embryonic Microglia Derive from Primitive Macrophages and Are Replaced by Cmyb-Dependent Definitive Microglia in Zebrafish." *Cell Reports* 24(1):130–41.
- Fiest, Kirsten M., Khara M. Sauro, Samuel Wiebe, Scott B. Patten, Churl Su Kwon, Jonathan Dykeman, Tamara Pringsheim, Diane L. Lorenzetti, and Nathalie Jetté. 2017. "Prevalence and Incidence of Epilepsy." *Neurology* 88(3):296–303.
- Fisher, Robert S., Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, Alicia Bogacz, J. Helen Cross, Christian E. Elger, Jerome Engel, Lars Forsgren, Jacqueline A. French, Mike Glynn, Dale C. Hesdorffer, B. I. Lee, Gary W. Mathern, Solomon L. Moshé, Emilio Perucca, Ingrid E. Scheffer, Torbjörn Tomson, Masako Watanabe, and Samuel Wiebe. 2014. "ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy." *Epilepsia* 55(4):475–82.
- Fisher, Robert S., J. Helen Cross, Carol D'Souza, Jacqueline A. French, Sheryl R. Haut, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshé, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer, Andreas Schulze-Bonhage, Ernest Somerville, Michael Sperling, Elza Márcia Yacubian, and Sameer M. Zuberi. 2017. "Instruction Manual for the ILAE 2017 Operational Classification of Seizure Types." *Epilepsia* 58(4):531–42.
- Fisher, Robert S., Walter Van Emde Boas, Warren Blume, Christian Elger, Pierre Genton, Phillip Lee, and Jerome Engel. 2005. "Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* 46(4):470–72.
- Fu, Ruying, Qingyu Shen, Pengfei Xu, Jin Jun Luo, and Yamei Tang. 2014. "Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases." *Molecular Neurobiology* 49(3):1422–34.
- Fuller, Tyson D., Trudi A. Westfall, Tirthasree Das, Deborah V Dawson, and Diane C. Slusarski. 2018. "High-Throughput Behavioral Assay to Investigate Seizure Sensitivity in Zebrafish Implicates ZFH3 in Epilepsy." *J Neurogenet* 32(2):319–35.
- Fulton, Stephen P., Kate Van Poppel, Amy L. McGregor, Basanagoud Mudigoudar, and James W. Wheless. 2017. "Vagus Nerve Stimulation in Intractable Epilepsy Associated with SCN1A Gene Abnormalities." *Journal of Child Neurology* 32(5):494–98.
- Gaitatzis, Athanasios, Sanjay M. Sisodiya, and Josemir W. Sander. 2012. "The Somatic Comorbidity of Epilepsy: A Weighty but Often Unrecognized Burden." *Epilepsia* 53(8):1282–93.
- Gasmi, Nadia, Fabrice P. Navarro, Michaël Ogier, Amor Belmeguenai, Thomas Lieutaud, Béatrice Georges, Jacques Bodennec, Marc Guénot, Nathalie Streichenberger, Philippe Ryvlin, Sylvain Rheims, and Laurent Bezin. 2021. "Low Grade Inflammation in the Epileptic Hippocampus Contrasts with Explosive Inflammation Occurring in the Acute Phase Following Status Epilepticus in Rats: Translation to Patients with Epilepsy." *BioRxiv* 2021.03.25.436701.
- Gawel, Kinga, Waldemar A. Turski, Wietske van der Ent, Benan J. Mathai, Karolina J. Kirstein-Smardzewska, Anne Simonsen, and Camila V. Esguerra. 2020. "Phenotypic Characterization of Larval Zebrafish (*Danio Rerio*) with Partial Knockdown of the *Cacna1a* Gene." *Molecular Neurobiology* 57(4):1904–16.
- Giacomotto, Jean and Laurent Ségalat. 2010. "High-Throughput Screening and Small Animal Models, Where Are We?" *British Journal of Pharmacology* 160(2):204–16.
- Van Gils, Matthias and Olivier M. Vanakker. 2019. "Morpholino-Mediated Gene Knockdown in Zebrafish: It Is All About Dosage and Validation." *Journal of Investigative Dermatology* 139(7):1599–1600.

- Ginhoux, Florent, Shawn Lim, Guillaume Hoeffel, Donovan Low, and Tara Huber. 2013. "Origin and Differentiation of Microglia." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(MAR).
- Goessling, Wolfram and Kirsten C. Sadler. 2015. "Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research." *Gastroenterology* 149(6):1361–77.
- Goetz, Laura H. and Nicholas J. Schork. 2018. "Personalized Medicine: Motivation, Challenges, and Progress." *Fertility and Sterility* 109(6):952–63.
- Gonzales, Andrew P. W. and Jing Ruey Joanna Yeh. 2014. "Cas9-Based Genome Editing in Zebrafish." Pp. 377–413 in *Methods in Enzymology*. Vol. 546. Academic Press Inc.
- Gore, Aniket V., Laura M. Pillay, Marina Venero Galanternik, and Brant M. Weinstein. 2018. "The Zebrafish: A Fantastic Model for Hematopoietic Development and Disease." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 7(3).
- Gosselin, David, Verena M. Link, Casey E. Romanoski, Gregory J. Fonseca, Dawn Z. Eichenfield, Nathanael J. Spann, Joshua D. Stender, Hyun B. Chun, Hannah Garner, Frederic Geissmann, and Christopher K. Glass. 2014. "Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities." *Cell* 159(6):1327–40.
- Gosselin, David, Dylan Skola, Nicole G. Coufal, Inge R. Holtman, Johannes C. M. Schlachetzki, Eniko Sajti, Baptiste N. Jaeger, Carolyn O'Connor, Conor Fitzpatrick, Martina P. Pasillas, Monique Pena, Amy Adair, David D. Gonda, Michael L. Levy, Richard M. Ransohoff, Fred H. Gage, and Christopher K. Glass. 2017. "An Environment-Dependent Transcriptional Network Specifies Human Microglia Identity." *Science* 356(6344):1248–59.
- Griffin, Aliesha, Mana Anvar, Kyla Hamling, and Scott C. Baraban. 2020. "Phenotype-Based Screening of Synthetic Cannabinoids in a Dravet Syndrome Zebrafish Model." *Frontiers in Pharmacology* 11.
- Griffin, Aliesha, Kyla R. Hamling, Kelly Knupp, Soon Gweon Hong, Luke P. Lee, and Scott C. Baraban. 2017. "Clemizole and Modulators of Serotonin Signalling Suppress Seizures in Dravet Syndrome." *Brain: A Journal of Neurology* 140(3):669–83.
- Grone, Brian P., Maria Marchese, Kyla R. Hamling, Maneesh G. Kumar, Christopher S. Krasniak, Federico Sicca, Filippo M. Santorelli, Manisha Patel, and Scott C. Baraban. 2016. "Epilepsy, Behavioral Abnormalities, and Physiological Comorbidities in Syntaxin-Binding Protein 1 (STXBP1) Mutant Zebrafish." *PLoS ONE* 11(3):1–25.
- Grone, Brian P., Tiange Qu, and Scott C. Baraban. 2017. "Behavioral Comorbidities and Drug Treatments in a Zebrafish Scn1Lab Model of Dravet Syndrome." *Eneuro* 4(4):ENEURO.0066-17.2017.
- Guerrini, Renzo, Charlotte Dravet, Pierre Genton, Anna Belmonte, Anna Kaminska, and Olivier Dulac. 1998. "Lamotrigine and Seizure Aggravation in Severe Myoclonic Epilepsy." *Epilepsia* 39(5):508–12.
- Hammond, Timothy R., Connor Dufort, Lasse Dissing-Olesen, Stefanie Giera, Adam Young, Alec Wysoker, Alec J. Walker, Frederick Gergits, Michael Segel, James Nemesh, Samuel E. Marsh, Arpiar Saunders, Evan Macosko, Florent Ginhoux, Jinmiao Chen, Robin J. M. Franklin, Xianhua Piao, Steven A. McCarroll, and Beth Stevens. 2019. "Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes." *Immunity* 50(1):253-271.e6.
- Hason, Martina and Petr Bartůněk. 2019. "Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate." *Genes* 10(11).
- Hassan-Abdi, Rahma, Alexandre Brenet, Mohamed Bennis, Constantin Yanicostas, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2019. "Neurons Expressing Pathological Tau Protein Trigger Dramatic Changes in Microglial Morphology and Dynamics." *Frontiers in Neuroscience* 13.

- Hata, Yukiko, Yuko Oku, Hiromichi Taneichi, Tomomi Tanaka, Noboru Igarashi, Yo Niida, and Naoki Nishida. 2020. "Two Autopsy Cases of Sudden Unexpected Death from Dravet Syndrome with Novel de Novo SCN1A Variants." *Brain and Development* 42(2):171–78.
- Haynes, Sharon E., Gunther Hollopeter, Guang Yang, Dana Kurpius, Michael E. Dailey, Wen Biao Gan, and David Julius. 2006. "The P2Y12 Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides." *Nature Neuroscience* 9(12):1512–19.
- Helmchen, Fritjof, Michale S. Fee, David W. Tank, and Winfried Denk. 2001. "A Miniature Head-Mounted Two-Photon Microscope: High-Resolution Brain Imaging in Freely Moving Animals." *Neuron* 31(6):903–12.
- Henshall, David C. and Brona M. Murphy. 2008. "Modulators of Neuronal Cell Death in Epilepsy." *Current Opinion in Pharmacology* 8(1):75–81.
- Herbomel, Philippe, Bernard Thisse, and Christine Thisse. 1999. "Ontogeny and Behaviour of Early Macrophages in the Zebrafish Embryo." *Development* 126(17):3735–45.
- Herbomel, Philippe, Bernard Thisse, and Christine Thisse. 2001. "Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process." *Developmental Biology* 238(2):274–88.
- Hickman, Suzanne E., Nathan D. Kingery, Toshiro K. Ohsumi, Mark L. Borowsky, Li Chong Wang, Terry K. Means, and Joseph El Khoury. 2013. "The Microglial Sensome Revealed by Direct RNA Sequencing." *Nature Neuroscience* 16(12):1896–1905.
- Hiragi, Toshimitsu, Yuji Ikegaya, and Ryuta Koyama. 2018. "Microglia after Seizures and in Epilepsy." *Cells* 7(4):26.
- Hortopan, Gabriela A., Matthew T. Dinday, and Scott C. Baraban. 2010. "Spontaneous Seizures and Altered Gene Expression in GABA Signaling Pathways in a Mind Bomb Mutant Zebrafish." *J Neurosci* 30(41):13718–28.
- Howard, Paul, Robert Twycross, John Shuster, Mary Mihalyo, Jan Rémi, and Andrew Wilcock. 2011. "Anti-Epileptic Drugs." *Journal of Pain and Symptom Management* 42(5):788–804.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews, Stuart McLaren, Ian Sealy, Mario Caccamo, Carol Churcher, Carol Scott, Jeffrey C. Barrett, Romke Koch, Gerd Jörg Rauch, Simon White, William Chow, Britt Kilian, Leonor T. Quintais, José A. Guerra-Assunção, Yi Zhou, Yong Gu, Jennifer Yen, Jan Hinnerk Vogel, Tina Eyre, Seth Redmond, Ruby Banerjee, Jianxiang Chi, Beiyuan Fu, Elizabeth Langley, Sean F. Maguire, Gavin K. Laird, David Lloyd, Emma Kenyon, Sarah Donaldson, Harminder Sehra, Jeff Almeida-King, Jane Loveland, Stephen Trevanion, Matt Jones, Mike Quail, Dave Willey, Adrienne Hunt, John Burton, Sarah Sims, Kirsten McLay, Bob Plumb, Joy Davis, Chris Clee, Karen Oliver, Richard Clark, Clare Riddle, David Elliott, Glen Threadgold, Glenn Harden, Darren Ware, Beverly Mortimer, Giselle Kerry, Paul Heath, Benjamin Phillimore, Alan Tracey, Nicole Corby, Matthew Dunn, Christopher Johnson, Jonathan Wood, Susan Clark, Sarah Pelan, Guy Griffiths, Michelle Smith, Rebecca Glithero, Philip Howden, Nicholas Barker, Christopher Stevens, Joanna Harley, Karen Holt, Georgios Panagiotidis, Jamieson Lovell, Helen Beasley, Carl Henderson, Daria Gordon, Katherine Auger, Deborah Wright, Joanna Collins, Claire Raisen, Lauren Dyer, Kenric Leung, Lauren Robertson, Kirsty Ambridge, Daniel Leongamornlert, Sarah McGuire, Ruth Gilderthorp, Coline Griffiths, Deepa Manthravadi, Sarah Nichol, Gary Barker, Siobhan Whitehead, Michael Kay, Jacqueline Brown, Clare Murnane, Emma Gray, Matthew Humphries, Neil Sycamore, Darren Barker, David Saunders, Justene Wallis, Anne Babbage, Sian Hammond, Maryam Mashreghi-Mohammadi, Lucy Barr, Sancha Martin, Paul Wray, Andrew Ellington, Nicholas Matthews, Matthew Ellwood, Rebecca Woodmansey, Graham Clark, James Cooper, Anthony Tromans, Darren Grafham, Carl Skuce, Richard Pandian, Robert Andrews, Elliot Harrison, Andrew Kimberley, Jane

- Garnett, Nigel Fosker, Rebekah Hall, Patrick Garner, Daniel Kelly, Christine Bird, Sophie Palmer, Ines Gehring, Andrea Berger, Christopher M. Dooley, Zübeyde Ersan-Ürün, Cigdem Eser, Horst Geiger, Maria Geisler, Lena Karotki, Anette Kirn, Judith Konantz, Martina Konantz, Martina Oberländer, Silke Rudolph-Geiger, Mathias Teucke, Kazutoyo Osoegawa, Baoli Zhu, Amanda Rapp, Sara Widaa, Cordelia Langford, Fengtang Yang, Nigel P. Carter, Jennifer Harrow, Zemin Ning, Javier Herrero, Steve M. J. Searle, Anton Enright, Robert Geisler, Ronald H. A. Plasterk, Charles Lee, Monte Westerfield, Pieter J. De Jong, Leonard I. Zon, John H. Postlethwait, Christiane Nüsslein-Volhard, Tim J. P. Hubbard, Hugues Roest Crollius, Jane Rogers, and Derek L. Stemple. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496(7446):498–503.
- Huang, Ren Qi, Cathy L. Bell-Horner, Mohammed I. Dibas, Douglas F. Covey, John A. Drewe, and Glenn H. Dillon. 2001. "Pentylentetrazole-Induced Inhibition of Recombinant γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptors: Mechanism and Site of Action." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298(3):986–95.
- Hulse, Elspeth J., James D. Haslam, Stevan R. Emmett, and Tom Woolley. 2019. "Organophosphorus Nerve Agent Poisoning: Managing the Poisoned Patient." *British Journal of Anaesthesia* 123(4):457–63.
- Hurst, Raymond, Hans Rollema, and Daniel Bertrand. 2013. "Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Basic Science to Therapeutics." *Pharmacology and Therapeutics* 137(1):22–54.
- Islam, Md Shahidul. 2020. "Calcium Signaling: From Basic to Bedside." Pp. 1–6 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 1131. Springer New York LLC.
- Jiří, Patočka. 2017. "What Killed Kim Jong-Nam? Was It the Agent VX?" Pp. 86–89 in *Military Medical Science Letters*. Vol. 86.
- John, Harald, Marcel J. van der Schans, Marianne Koller, Helma E. T. Spruit, Franz Worek, Horst Thiermann, and Daan Noort. 2018. "Fatal Sarin Poisoning in Syria 2013: Forensic Verification within an International Laboratory Network." *Forensic Toxicology* 36(1):61–71.
- Jontes, James D. and Michelle R. Emond. 2012. "In Vivo Imaging of Synaptogenesis in Zebrafish." *Cold Spring Harbor Protocols* 7(5):528–34.
- Kabashi, Edor, Edna Brustein, Nathalie Champagne, and Pierre Drapeau. 2011. "Zebrafish Models for the Functional Genomics of Neurogenetic Disorders." *Biochimica et Biophysica Acta* 1812(3):335–45.
- Kameyama, K. and T. Haga. 1990. "Muscarinic Acetylcholine Receptor." *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme* 35(4 Suppl):677–86.
- Karlsson, Johnny, Jonas Von Hofsten, and Per Erik Olsson. 2001. "Generating Transparent Zebrafish: A Refined Method to Improve Detection of Gene Expression during Embryonic Development." *Marine Biotechnology* 3(6):522–27.
- Kaushal, Jyoti, Madhu Khatri, and Shailendra Kumar Arya. 2021. "A Treatise on Organophosphate Pesticide Pollution: Current Strategies and Advancements in Their Environmental Degradation and Elimination." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207.
- Keezer, Mark R., Sanjay M. Sisodiya, and Josemir W. Sander. 2016. "Comorbidities of Epilepsy: Current Concepts and Future Perspectives." *The Lancet Neurology* 15(1):106–15.
- Khalili, Arezoo, Amir Reza Peimani, Nickie Safarian, Khaled Youssef, Georg Zoidl, and Pouya Rezai. 2019. "Phenotypic Chemical and Mutant Screening of Zebrafish Larvae Using an On-Demand Response to Electric Stimulation." *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 11(10):373–83.
- Khazipov, Roustem, Guzel Valeeva, and Ilgam Khalilov. 2015. "Depolarizing GABA and Developmental Epilepsies." *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21(2):83–91.

- Kim, Yun Bae, Gyeung Haeng Hur, Sungho Shin, Dai Eun Sok, Jong Koo Kang, and Yong Soon Lee. 1999. "Organophosphate-Induced Brain Injuries: Delayed Apoptosis Mediated by Nitric Oxide." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 7(2):147–52.
- Knupp, Kelly G. and Elaine C. Wirrell. 2018. "Treatment Strategies for Dravet Syndrome." *CNS Drugs* 32(4):335–50.
- Kotloski, Robert, Michael Lynch, Suzanne Lauersdorf, and Thomas Sutula. 2002. "Repeated Brief Seizures Induce Progressive Hippocampal Neuron Loss and Memory Deficits." Pp. 95–110 in *Progress in Brain Research*. Vol. 135. Elsevier.
- Kröll-Seger, J., P. Portilla, O. Dulac, and Catherine Chiron. 2006. "Topiramate in the Treatment of Highly Refractory Patients with Dravet Syndrome." *Neuropediatrics* 37(6):325–29.
- Kumar, Maneesh G., Shane Rowley, Ruth Fulton, Matthew T. Dinday, Scott C. Baraban, and Manisha Patel. 2016. "Altered Glycolysis and Mitochondrial Respiration in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome." *ENeuro* 3(2):1–12.
- Kwon, Young Se, Eduardo Pineda, Stéphane Auvin, Don Shin, Andrey Mazarati, and Raman Sankar. 2013. "Neuroprotective and Antiepileptogenic Effects of Combination of Anti-Inflammatory Drugs in the Immature Brain." *Journal of Neuroinflammation* 10.
- Kyrargyri, Vasiliki, Christian Madry, Ali Rifat, I. Lorena Arancibia-Carcamo, Steffan P. Jones, Victor T. T. Chan, Yajing Xu, Bernard Robaye, and David Attwell. 2020. "P2Y13 Receptors Regulate Microglial Morphology, Surveillance, and Resting Levels of Interleukin 1 β Release." *GLIA* 68(2):328–44.
- Lagae, Lieven, Joseph Sullivan, Kelly Knupp, Linda Laux, Tilman Polster, Marina Nikanorova, Orrin Devinsky, J. Helen Cross, Renzo Guerrini, Dinesh Talwar, Ian Miller, Gail Farfel, Bradley S. Galer, Arnold Gammaitoni, Arun Mistry, Glenn Morrison, Michael Lock, Anupam Agarwal, Wyman W. Lai, and Bertien Ceulemans. 2019. "Fenfluramine Hydrochloride for the Treatment of Seizures in Dravet Syndrome: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet* 394(10216):2243–54.
- Laird, Angela S. and Wim Robberecht. 2011. "Modeling Neurodegenerative Diseases in Zebrafish Embryos." *Methods in Molecular Biology* 793:167–84.
- de Lanerolle, N. C., J. H. Kim, R. J. Robbins, and D. D. Spencer. 1989. "Hippocampal Interneuron Loss and Plasticity in Human Temporal Lobe Epilepsy." *Brain Research* 495(2):387–95.
- Laux, Linda and Robyn Blackford. 2013. "The Ketogenic Diet in Dravet Syndrome." *Journal of Child Neurology* 28(8):1041–44.
- Lee, Gang Hui, Shian Ying Sung, Wen Ni Chang, Tseng Ting Kao, Hung Chi Du, Tsun Hsien Hsiao, Martin K. Safo, and Tzu Fun Fu. 2012. "Zebrafish Larvae Exposed to Ginkgotoxin Exhibit Seizure like Behavior That Is Relieved by Pyridoxal-5'-Phosphate, GABA and Anti-Epileptic Drugs." *DMM Disease Models and Mechanisms* 5(6):785–95.
- Lee, Yunkyong, Dohee Kim, Yeon Hwa Kim, Hansol Lee, and Chang Joong Lee. 2010. "Improvement of Pentylentetrazol-Induced Learning Deficits by Valproic Acid in the Adult Zebrafish." *European Journal of Pharmacology* 643(2–3):225–31.
- Lehtimäki, K. A., T. Keränen, H. Huhtala, M. Hurme, J. Ollikainen, J. Honkaniemi, J. Palmio, and J. Peltola. 2004. "Regulation of IL-6 System in Cerebrospinal Fluid and Serum Compartments by Seizures: The Effect of Seizure Type and Duration." *Journal of Neuroimmunology* 152(1–2):121–25.
- Lenz, Kathryn M. and Lars H. Nelson. 2018. "Microglia and beyond: Innate Immune Cells as Regulators of Brain Development and Behavioral Function." *Frontiers in Immunology* 9(APR):1.
- Leong, Ivone Un San, Daniel Lai, Chuan Ching Lan, Ross Johnson, Donald R. Love, Ross Johnson,

- and Donald R. Love. 2011. "Targeted Mutagenesis of Zebrafish: Use of Zinc Finger Nucleases." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 93(3):249–55.
- Li, Qinrui, Ying Han, Junbao Du, Hongfang Jin, Jing Zhang, Manman Niu, and Jiong Qin. 2018. "Alterations of Apoptosis and Autophagy in Developing Brain of Rats with Epilepsy: Changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 Levels." *Neuroscience Research* 130:47–55.
- Li, Ying, Xu Fei Du, Chang Sheng Liu, Zi Long Wen, and Jiu Lin Du. 2012. "Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo." *Developmental Cell* 23(6):1189–1202.
- Liao, Meijiang, Uday Kundap, Richard E. Rosch, Dominic R. W. Burrows, Martin P. Meyer, Bouchra Ouled Amar Bencheikh, Patrick Cossette, and Éric Samarut. 2019. "Targeted Knockout of GABA-A Receptor Gamma 2 Subunit Provokes Transient Light-Induced Reflex Seizures in Zebrafish Larvae." *DMM Disease Models and Mechanisms* 12(11).
- Lin, Michael Z. and Mark J. Schnitzer. 2016. "Genetically Encoded Indicators of Neuronal Activity." *Nature Neuroscience* 19(9):1142–53.
- Littré, Emile. 1849. "De La Maladie Sacrée, Livre 6." P. 364 in *Oeuvre complètes d'Hippocrate*, edited by Baillière.
- Liu, Jing and Scott C. Baraban. 2019. "Network Properties Revealed during Multi-Scale Calcium Imaging of Seizure Activity in Zebrafish." *ENeuro* 6(1).
- Liu, Xiuyun, Jia Lin, Yinglan Zhang, Ning Guo, and Qiang Li. 2018. "Sound Shock Response in Larval Zebrafish: A Convenient and High-Throughput Assessment of Auditory Function." *Neurotoxicology and Teratology* 66(December 2017):1–7.
- Liu, Yuhan, Vasily Grigorovsky, and Berj Bardakjian. 2020. "Excitation and Inhibition Balance Underlying Epileptiform Activity." *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 67(9):2473–81.
- Liu, Yun, Hui Zhao, and Christopher H. K. Cheng. 2016. "Mutagenesis in *Xenopus* and Zebrafish Using TALENs." Pp. 207–27 in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Vol. 1338. Methods Mol Biol.
- Łukawski, Krzysztof, Marta Andres-Mach, Mirosław Czuczwar, Jarogniew J. Łuszczki, Krzysztof Kruszyński, and Stanisław J. Czuczwar. 2018. "Mechanisms of Epileptogenesis and Preclinical Approach to Antiepileptogenic Therapies." *Pharmacological Reports* 70(2):284–93.
- Macdonald, Robert L. and Jeffery L. Barker. 1978. "Specific Antagonism of GABA-Mediated Postsynaptic Inhibition in Cultured Mammalian Spinal Cord Neurons: A Common Mode of Convulsant Action." *Neurology* 28(4):325–30.
- MacRae, Calum A. and Randall T. Peterson. 2015. "Zebrafish as Tools for Drug Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* 14(10):721–31.
- Madeja, Michael, Ulrich Mußhoff, Christoph Lorra, Olaf Pongs, and Erwin Josef Speckmann. 1996. "Mechanism of Action of the Epileptogenic Drug Pentylentetrazol on a Cloned Neuronal Potassium Channel." *Brain Research* 722(1–2):59–70.
- Magiorkinis, Emmanouil, Kalliopi Sidiropoulou, and Aristidis Diamantis. 2010. "Hallmarks in the History of Epilepsy: Epilepsy in Antiquity." *Epilepsy and Behavior* 17(1):103–8.
- Mairesse, Jérôme, Manuela Zinni, Julien Pansiot, Rahma Hassan-Abdi, Charlie Demene, Marina Colella, Christiane Charriaut-Marlangue, Aline Rideau Batista Novais, Mickael Tanter, Stefania Maccari, Pierre Gressens, Daniel Vaiman, Nadia Soussi-Yanicostas, and Olivier Baud. 2019. "Oxytocin Receptor Agonist Reduces Perinatal Brain Damage by Targeting Microglia." *GLIA* 67(2):345–59.

- Marchi, Nicola, Lilyana Angelov, Thomas Masaryk, Vincent Fazio, Tiziana Granata, Nadia Hernandez, Kerri Hallene, Tammy Diglaw, Linda Franic, Imad Najm, and Damir Janigro. 2007. "Seizure-Promoting Effect of Blood-Brain Barrier Disruption." *Epilepsia* 48(4):732–42.
- Marin-Valencia, Isaac, Gaia Novarino, Anide Johansen, Basak Rosti, Mahmoud Y. Issa, Damir Musaev, Gifty Bhat, Eric Scott, Jennifer L. Silhavy, Valentina Stanley, Rasim O. Rosti, Jeremy W. Gleeson, Farhad B. Imam, Maha S. Zaki, and Joseph G. Gleeson. 2017. "A Homozygous Founder Mutation in TRAPPC6B Associates with a Neurodevelopmental Disorder Characterised by Microcephaly, Epilepsy and Autistic Features." *J Med Genet* 55(1):48–54.
- Marini, Carla, Ingrid E. Scheffer, Rima Nabbout, Arvid Suls, Peter De Jonghe, Federico Zara, and Renzo Guerrini. 2011. "The Genetics of Dravet Syndrome." *Epilepsia* 52(SUPPL. 2):24–29.
- Mathews, Gregory C. 2007. "A Possible Explanation for the Paradox of Hyperexcitability and Epilepsy in 'Loss of Function' Voltage-Gated Sodium Channel Mutations." *Epilepsy Currents* 7(2):54–55.
- Mazaheri, Fargol, Oksana Breus, Sevi Durdu, Petra Haas, Jochen Wittbrodt, Darren Gilmour, and Francesca Peri. 2014. "Distinct Roles for BAI1 and TIM-4 in the Engulfment of Dying Neurons by Microglia." *Nature Communications* 5(1):1–11.
- McMahon, Shane M. and Meyer B. Jackson. 2018. "An Inconvenient Truth: Calcium Sensors Are Calcium Buffers." *Trends in Neurosciences* 41(12):880–84.
- McNamara, James O., Yang Zhong Huang, and A. Soren Leonard. 2006. "Molecular Signaling Mechanisms Underlying Epileptogenesis." *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2006(356).
- Mei, X., S. Wu, A. G. Bassuk, and D. C. Slusarski. 2013. "Mechanisms of Prickle1a Function in Zebrafish Epilepsy and Retinal Neurogenesis." *Disease Models & Mechanisms* 6(3):679–88.
- Mew, Emma J., Prianka Padmanathan, Flemming Konradsen, Michael Eddleston, Shu Sen Chang, Michael R. Phillips, and David Gunnell. 2017. "The Global Burden of Fatal Self-Poisoning with Pesticides 2006-15: Systematic Review." *Journal of Affective Disorders* 219:93–104.
- Morgan, James I., Donna R. Cohen, James L. Hempstead, and Tom Curran. 1987. "Mapping Patterns of C-Fos Expression in the Central Nervous System after Seizure." *Science* 237(4811):192–97.
- Morin-Brureau, Mélanie, Giampaolo Miliore, Juliette Royer, Farah Chali, Caroline LeDuigou, Etienne Savary, Corinne Blugeon, Laurent Jourdain, David Akbar, Sophie Dupont, Vincent Navarro, Michel Baulac, Franck Bielle, Bertrand Math, Stéphane Clemenceau, and Richard Miles. 2018. "Microglial Phenotypes in the Human Epileptic Temporal Lobe." *Brain* 141:3343–60.
- Mueller, Thomas and Mario F. Wullmann. 2016. *Atlas of Early Zebrafish Brain Development: A Tool for Molecular Neurogenetics - 2nd Edition*. Elsevier.
- Mussulini, Ben Hur M., Carlos E. Leite, Kamila C. Zenki, Luana Moro, Suelen Baggio, Eduardo P. Rico, Denis B. Rosemberg, Renato D. Dias, Tadeu M. Souza, Maria E. Calcagnotto, Maria M. Campos, Ana M. Battastini, and Diogo L. de Oliveira. 2013. "Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization." *PLoS ONE* 8(1).
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, and Dorian B. McGavern. 2014. "Microglia Development and Function." *Annual Review of Immunology* 32:367–402.
- Nguyen-Chi, Mai, Beryl Laplace-Builhe, Jana Travnickova, Patricia Luz-Crawford, Gautier Tejedor, Quang Tien Phan, Isabelle Duroux-Richard, Jean Pierre Levraud, Karima Kissa, Georges Lutfalla, Christian Jorgensen, and Farida Djouad. 2015. "Identification of Polarized

- Macrophage Subsets in Zebrafish." *ELife* 4(JULY 2015).
- Nicita, Francesco, Alberto Spalice, Laura Papetti, Marina Nikanorova, Paola Iannetti, and Pasquale Parisi. 2014. "Efficacy of Verapamil as an Adjunctive Treatment in Children with Drug-Resistant Epilepsy: A Pilot Study." *Seizure* 23(1):36–40.
- Nimmerjahn, A., Frank Kirchhoff, and Fritjof Helmchen. 2005. "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo." *Science* 308(5726):1314–18.
- Novak, Alicia E., Manda C. Jost, Ying Lu, Alison D. Taylor, Harold H. Zakon, and Angeles B. Ribera. 2006. "Gene Duplications and Evolution of Vertebrate Voltage-Gated Sodium Channels." *Journal of Molecular Evolution* 63(2):208–21.
- Novak, Alicia E., Alison D. Taylor, Ricardo H. Pineda, Erika L. Lasda, Melissa A. Wright, and Angeles B. Ribera. 2006. "Embryonic and Larval Expression of Zebrafish Voltage-Gated Sodium Channel α -Subunit Genes." *Developmental Dynamics* 235(7):1962–73.
- OCDE. 1998. "Test No. 212: Fish, Short-Term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages." in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. OECD.
- OCDE. 2013. "Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test." in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. OECD.
- Ogiwara, Ikuo, Hiroyuki Miyamoto, Noriyuki Morita, Nafiseh Atapour, Emi Mazaki, Ikuyo Inoue, Tamaki Takeuchi, Shigeyoshi Itoharu, Yuchio Yanagawa, Kunihiko Obata, Teiichi Furuichi, Takao K. Hensch, and Kazuhiro Yamakawa. 2007. "Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an Scn1a Gene Mutation." *Journal of Neuroscience* 27(22):5903–14.
- Orellana-Paucar, Adriana Monserrath, Tatiana Afrikanova, Joice Thomas, Yelaman K. Aibulidinov, Wim Dehaen, Peter A. M. De Witte, and Camila V. Esguerra. 2013. "Insights from Zebrafish and Mouse Models on the Activity and Safety of Ar-Turmerone as a Potential Drug Candidate for the Treatment of Epilepsy." *PLoS ONE* 8(12).
- Orger, Michael B. and Gonzalo G. De Polavieja. 2017. "Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges." *Annual Review of Neuroscience* 40:125–47.
- Orihuela, Ruben, Christopher A. McPherson, and Gaylia Jean Harry. 2016. "Microglial M1/M2 Polarization and Metabolic States." *British Journal of Pharmacology* 173(4):649–65.
- Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Scianni, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, Tiago Alves Ferreira, Eva Guiducci, Laura Dumas, Davide Ragozzino, and Cornelius T. Gross. 2011. "Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development." *Science* 333(6048):1456–58.
- Parichy, David M., Michael R. Elizondo, Margaret G. Mills, Tiffany N. Gordon, and Raymond E. Engeszer. 2009. "Normal Table of Postembryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish." *Developmental Dynamics* 238(12):2975–3015.
- Patel, Dipan C., Bhanu P. Tewari, Lata Chaunsali, and Harald Sontheimer. 2019. "Neuron–Glia Interactions in the Pathophysiology of Epilepsy." *Nature Reviews Neuroscience* 20(5):282–97.
- Paudel, Yam Nath, Mohd Farooq Shaikh, Sadia Shah, Yatinesh Kumari, and Iekhsan Othman. 2018. "Role of Inflammation in Epilepsy and Neurobehavioral Comorbidities: Implication for Therapy." *European Journal of Pharmacology* 837:145–55.
- Peltola, J., J. Laaksonen, A. M. Haapala, M. Hurme, S. Rainesalo, and T. Keränen. 2002. "Indicators of Inflammation after Recent Tonic-Clonic Epileptic Seizures Correlate with Plasma Interleukin-6 Levels." *Seizure* 11(1):44–46.

- Pena, Izabella A., Yann Roussel, Kate Daniel, Kevin Mongeon, Devon Johnstone, Hellen Weinschutz Mendes, Marjolein Bosma, Vishal Saxena, Nathalie Lepage, Pranesh Chakraborty, David A. Dymont, Clara D. M. van Karnebeek, Nanda Verhoeven-Duif, Tuan Vu Bui, Kym M. Boycott, Marc Ekker, and Alex MacKenzie. 2017. "Pyridoxine-Dependent Epilepsy in Zebrafish Caused by Aldh7a1 Deficiency." *Genetics* 207:1501–18.
- Pérez-Cerdá, Fernando, María Victoria Sánchez-Gómez, and Carlos Matute. 2015. "Pío Del Río Hortega and the Discovery of the Oligodendrocytes." *Frontiers in Neuroanatomy* 9(July).
- Pernea, Marius and Alastair G. Sutcliffe. 2016. "Clobazam and Its Use in Epilepsy." *Pediatric Reports* 8(2):34–38.
- Perucca, Piero, Ingrid E. Scheffer, and Michelle Kiley. 2018. "The Management of Epilepsy in Children and Adults." *Medical Journal of Australia* 208(5):226–33.
- Pisharath, Harshan and Michael J. Parsons. 2009. "Nitroreductase-Mediated Cell Ablation in Transgenic Zebrafish Embryos." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 546:133–43.
- Porter, R. J., J. J. Cereghino, G. D. Gladding, B. J. Hessie, H. J. Kupferberg, B. Scoville, and B. G. White. 1984. "Antiepileptic Drug Development Program." *Cleveland Clinic Quarterly* 51(2):293–305.
- Quiñonez-Silvero, Claudia, Kathleen Hübner, and Wiebke Herzog. 2020. "Development of the Brain Vasculature and the Blood-Brain Barrier in Zebrafish." *Developmental Biology* 457(2):181–90.
- Radu, Beatrice Mihaela, Florin Bogdan Epureanu, Mihai Radu, Paolo Francesco Fabene, and Giuseppe Bertini. 2017. "Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Clinical and Experimental Epilepsy." *Epilepsy Research* 131:15–27.
- Rahn, J. J., J. E. Bestman, B. J. Josey, E. S. Inks, K. D. Stackley, C. E. Rogers, C. J. Chou, and S. S. L. Chan. 2014. "Novel Vitamin K Analogs Suppress Seizures in Zebrafish and Mouse Models of Epilepsy." *Neuroscience* 259:142–54.
- Raj, Bushra, Jeffrey A. Farrell, Jialin Liu, Jakob El Kholtei, Adam N. Carte, Joaquin Navajas Acedo, Lucia Y. Du, Aaron McKenna, Đorđe Relić, Jessica M. Leslie, and Alexander F. Schier. 2020. "Emergence of Neuronal Diversity during Vertebrate Brain Development." *Neuron* 108(6):1058-1074.e6.
- Ramirez, Irene Barinaga Rementeria, Grzegorz Pietka, David R. Jones, Nullin Divecha, A. Alia, Scott C. Baraban, Adam F. L. Hurlstone, and Martin Lowe. 2012. "Impaired Neural Development in a Zebrafish Model for Lowe Syndrome." *Human Molecular Genetics* 21(8):1744–59.
- Rana, Anna and Alberto E. Musto. 2018. "The Role of Inflammation in the Development of Epilepsy." *Journal of Neuroinflammation* 15(1).
- Ransohoff, Richard M. 2016. "A Polarizing Question: Do M1 and M2 Microglia Exist." *Nature Neuroscience* 19(8):987–91.
- Rassendren, François and Etienne Audinat. 2016. "Purinergic Signaling in Epilepsy." *Journal of Neuroscience Research* 94(9):781–93.
- Ravizza, Teresa, Barbara Gagliardi, Francesco Noé, Karin Boer, Eleonora Aronica, and Annamaria Vezzani. 2008. "Innate and Adaptive Immunity during Epileptogenesis and Spontaneous Seizures: Evidence from Experimental Models and Human Temporal Lobe Epilepsy." *Neurobiology of Disease* 29(1):142–60.
- Río-Hortega Bereciartu, Juan. 2020. "Pío Del Río-Hortega: The Revolution of Glia." *The Anatomical Record* 303(5):1232–41.
- Rosander, Cecilia and Tove Hallböök. 2015. "Dravet Syndrome in Sweden: A Population-Based

- Study." *Developmental Medicine and Child Neurology* 57(7):628–33.
- Roseti, Cristina, Erwin A. van Vliet, Pierangelo Cifelli, Gabriele Ruffolo, Johannes C. Baayen, Maria Amalia Di Castro, Cristina Bertolini, Cristina Limatola, Eleonora Aronica, Annamaria Vezzani, and Eleonora Palma. 2015. "GABAA Currents Are Decreased by IL-1 β in Epileptogenic Tissue of Patients with Temporal Lobe Epilepsy: Implications for Ictogenesis." *Neurobiology of Disease* 82:311–20.
- Russell, James T. 2011. "Imaging Calcium Signals in Vivo: A Powerful Tool in Physiology and Pharmacology." *British Journal of Pharmacology* 163(8):1605–25.
- Saito, Y., H. Oguni, Y. Awaya, K. Hayashi, and M. Osawa. 2001. "Phenytoin-Induced Choreoathetosis in Patients with Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy." *Neuropediatrics* 32(5):231–35.
- Salgueiro-Pereira, Ana Rita, Fabrice Duprat, Paula A. Pousinha, Alexandre Loucif, Vincent Douchamps, Cristina Regondi, Marion Ayrault, Martine Eugie, Marion I. Stunault, Andrew Escayg, Romain Goutagny, Vadym Gnatkovsky, Carolina Frassoni, Hélène Marie, Ingrid Bethus, and Massimo Mantegazza. 2019. "A Two-Hit Story: Seizures and Genetic Mutation Interaction Sets Phenotype Severity in SCN1A Epilepsies." *Neurobiology of Disease* 125:31–44.
- Salter, Michael W. and Beth Stevens. 2017. "Microglia Emerge as Central Players in Brain Disease." *Nature Medicine* 23(9):1018–27.
- Sam, Kishore Gnana, Krishnakanth Kondabolu, Dipanwita Pati, Asha Kamath, G. Pradeep Kumar, and Padma G. M. Rao. 2009. "Poisoning Severity Score, APACHE II and GCS: Effective Clinical Indices for Estimating Severity and Predicting Outcome of Acute Organophosphorus and Carbamate Poisoning." *Journal of Forensic and Legal Medicine* 16(5):239–47.
- Samarut,   ric, Amrutha Swaminathan, Rapha  lle Rich  , Meijiang Liao, Rahma Hassan-Abdi, Solène Renault, Marc Allard, Liselotte Dufour, Patrick Cossette, Nadia Soussi-Yanicostas, and Pierre Drapeau. 2018. "  -Aminobutyric Acid Receptor Alpha 1 Subunit Loss of Function Causes Genetic Generalized Epilepsy by Impairing Inhibitory Network Neurodevelopment." *Epilepsia* 59(11):2061–74.
- Satta, Valentina, Cristina Alonso, Paula Díez, Soraya Martín-Suárez, Marta Rubio, Juan M. Encinas, Javier Fernández-Ruiz, and Onintza Sagredo. 2021. "Neuropathological Characterization of a Dravet Syndrome Knock-In Mouse Model Useful for Investigating Cannabinoid Treatments." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13:602801.
- Schafer, Dorothy P., Emily K. Lehrman, Amanda G. Kautzman, Ryuta Koyama, Alan R. Mardinly, Ryo Yamasaki, Richard M. Ransohoff, Michael E. Greenberg, Ben A. Barres, and Beth Stevens. 2012. "Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner." *Neuron* 74(4):691–705.
- Schartz, Nicole D., Season K. Wyatt-Johnson, Lauren R. Price, Samantha A. Colin, and Amy L. Brewster. 2018. "Status Epilepticus Triggers Long-Lasting Activation of Complement C1q-C3 Signaling in the Hippocampus That Correlates with Seizure Frequency in Experimental Epilepsy." *Neurobiology of Disease* 109(Pt A):163–73.
- Schoonheim, Peter J., Aristides B. Arrenberg, Filippo Del Bene, and Herwig Baier. 2010. "Optogenetic Localization and Genetic Perturbation of Saccade-Generating Neurons in Zebrafish." *Journal of Neuroscience* 30(20):7111–20.
- Schubert, Julian, Aleksandra Siekierska, Mélanie Langlois, Patrick May, Clément Huneau, Felicitas Becker, Hiltrud Muhle, Arvid Suls, Johannes R. Lemke, Carolien G. F. De Kovel, Holger Thiele, Kathryn Konrad, Amit Kawalia, Mohammad R. Toliat, Thomas Sander, Franz R  schendorf, Almuth Caliebe, Inga Nagel, Bernard Kohl, Angela Kecskés, Maxime Jacmin,

- Katia Hardies, Sarah Weckhuysen, Erik Riesch, Thomas Dorn, Eva H. Brilstra, Stephanie Baulac, Rikke S. Møller, Helle Hjalgrim, Bobby P. C. Koeleman, Karin Jurkat-Rott, Frank Lehman-Horn, Jared C. Roach, Gustavo Glusman, Leroy Hood, David J. Galas, Benoit Martin, Peter A. M. De Witte, Saskia Biskup, Peter De Jonghe, Ingo Helbig, Rudi Balling, Peter Nürnberg, Alexander D. Crawford, Camila V. Esguerra, Yvonne G. Weber, and Holger Lerche. 2014. "Mutations in STX1B, Encoding a Presynaptic Protein, Cause Fever-Associated Epilepsy Syndromes." *Nature Genetics* 46(12):1327–32.
- Shao, Li-Rong, Christa W. Habela, and Carl E. Stafstrom. 2019. "Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance." *Children* 6(2):23.
- Sharma, Dipakshi, Avinash Nagpal, Yogesh B. Pakade, and Jatinder Kaur Katnoria. 2010. "Analytical Methods for Estimation of Organophosphorus Pesticide Residues in Fruits and Vegetables: A Review." *Talanta* 82(4):1077–89.
- Shmuelly, Sharon, Sanjay M. Sisodiya, W. Boudewijn Gunning, Josemir W. Sander, and Roland D. Thijs. 2016. "Mortality in Dravet Syndrome: A Review." *Epilepsy and Behavior* 64(Pt A):69–74.
- Sidhu, Gurpreet Kaur, Simranjeet Singh, Vijay Kumar, Daljeet Singh Dhanjal, Shivika Datta, and Joginder Singh. 2019. "Toxicity, Monitoring and Biodegradation of Organophosphate Pesticides: A Review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49(13):1135–87.
- Sieger, Dirk, Christian Moritz, Thomas Ziegenhals, Sergey Prykhozhiy, and Francesca Peri. 2012. "Long-Range Ca²⁺ Waves Transmit Brain-Damage Signals to Microglia." *Developmental Cell* 22(6):1138–48.
- Sieger, Dirk and Francesca Peri. 2013. "Animal Models for Studying Microglia: The First, the Popular, and the New." *GLIA* 61(1):3–9.
- Sigman, Mark. 2018. "Introduction: Personalized Medicine: What Is It and What Are the Challenges?" *Fertility and Sterility* 109(6):944–45.
- Singh, S. and N. Sharma. 2000. "Neurological Syndromes Following Organophosphate Poisoning." *Neurology India* 48(4):308–13.
- Smith, Amy M., Hannah M. Gibbons, Robyn L. Oldfield, Peter M. Bergin, Edward W. Mee, Richard L. M. Faull, and Mike Dragunow. 2013. "The Transcription Factor PU.1 Is Critical for Viability and Function of Human Brain Microglia." *GLIA* 61(6):929–42.
- Snoeijs-Schouwenaars, F. M., M. J. B. M. Veendrick, P. Van Mierlo, G. Van Erp, A. J. A. De Louw, B. U. Kleine, H. J. Schelhaas, and I. Y. Tan. 2015. "Carbamazepine and Oxcarbazepine in Adult Patients with Dravet Syndrome: Friend or Foe?" *Seizure* 29:114–18.
- Soares, Sofia, Tiago Rosado, Mário Barroso, Duarte Nuno Vieira, and Eugenia Gallardo. 2019. "Organophosphorus Pesticide Determination in Biological Specimens: Bioanalytical and Toxicological Aspects." *International Journal of Legal Medicine* 133(6):1763–84.
- Sourbron, Jo, Henning Schneider, Angéla Kecskés, Yusu Liu, Ellen M. Buening, Lieven Lagae, Ilse Smolders, and Peter De Witte. 2016. "Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model." *ACS Chemical Neuroscience* 7(5):588–98.
- Stainier, Didier Y. R., Erez Raz, Nathan D. Lawson, Stephen C. Ekker, Rebecca D. Burdine, Judith S. Eisen, Philip W. Ingham, Stefan Schulte-Merker, Deborah Yelon, Brant M. Weinstein, Mary C. Mullins, Stephen W. Wilson, Lalita Ramakrishnan, Sharon L. Amacher, Stephan C. F. Neuhauss, Anming Meng, Naoki Mochizuki, Pertti Panula, and Cecilia B. Moens. 2017. "Guidelines for Morpholino Use in Zebrafish." *PLoS Genetics* 13(10).
- Steel, Dora, Joseph D. Symonds, Sameer M. Zuberi, and Andreas Brunklaus. 2017. "Dravet Syndrome and Its Mimics: Beyond SCN1A." *Epilepsia* 58(11):1807–16.

- Stephan, Alexander H., Ben A. Barres, and Beth Stevens. 2012. "The Complement System: An Unexpected Role in Synaptic Pruning during Development and Disease." *Annual Review of Neuroscience* 35:369–89.
- Stewart, Adam Michael, Daniel Desmond, Evan Kyzar, Siddharth Gaikwad, Andrew Roth, Russell Riehl, Christopher Collins, Louis Monnig, Jeremy Green, and Allan V. Kalueff. 2012. "Perspectives of Zebrafish Models of Epilepsy: What, How and Where Next?" *Brain Research Bulletin* 87(2–3):135–43.
- Sundin, Josefin, Rachael Morgan, Mette H. Finnøen, Arpita Dey, Kripan Sarkar, and Fredrik Jutfelt. 2019. "On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio Rerio*) in India." *Zebrafish* 16(6):546–53.
- Swaminathan, Amrutha, Rahma Hassan-Abdi, Solène Renault, Aleksandra Siekierska, Raphaëlle Riché, Meijiang Liao, Peter A. M. de Witte, Constantin Yanicostas, Nadia Soussi-Yanicostas, Pierre Drapeau, and Eric Samarut. 2018. "In Regulating GABAergic Network Development Article Non-Canonical MTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development." *Current Biology* 28:1924–37.
- Swartz, Barbara E., Carolyn R. Houser, Uwami Tomiyasu, Gregory O. Walsh, Antonio DeSalles, J. Ronald Rich, and Antonio Delgado-Escueta. 2006. "Hippocampal Cell Loss in Posttraumatic Human Epilepsy." *Epilepsia* 47(8):1373–82.
- Swinney, David C. and Jason Anthony. 2011. "How Were New Medicines Discovered?" *Nature Reviews Drug Discovery* 10(7):507–19.
- Sztal, Tamar E., Avnika A. Ruparelia, Caitlin Williams, and Robert J. Bryson-Richardson. 2016. "Using Touch-Evoked Response and Locomotion Assays to Assess Muscle Performance and Function in Zebrafish." *Journal of Visualized Experiments* 2016(116).
- Tanimoto, Tetsuya, Yasuo Oshima, Koichiro Yuji, Akihiko Ozaki, and Masahiro Kami. 2017. "Organophosphate Poisoning and Terrorism." *Malaysian Journal of Medical Sciences* 24(4):111–12.
- Teng, Yong, Xiayang Xie, Steven Walker, Grzegorz Rempala, David J. Kozłowski, Jeff S. Mumm, and John K. Cowell. 2010. "Knockdown of Zebrafish *Lgi1a* Results in Abnormal Development, Brain Defects and a Seizure-like Behavioral Phenotype." *Human Molecular Genetics* 19(22):4409–20.
- Teng, Yong, Xiayang Xie, Steven Walker, Meera Saxena, David J. Kozłowski, Jeff S. Mumm, and John K. Cowell. 2011. "Loss of Zebrafish *Lgi1b* Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylentetrazol Induced Seizure-like Behavior." *PLoS ONE* 6(9).
- Terrone, Gaetano, Silvia Balosso, Alberto Pauletti, Teresa Ravizza, and Annamaria Vezzani. 2020. "Inflammation and Reactive Oxygen Species as Disease Modifiers in Epilepsy." *Neuropharmacology* 167:107742.
- Thornton, Cammi, Kennedy E. Dickson, Dennis R. Carty, Nicole M. Ashpole, and Kristine L. Willett. 2020. "Cannabis Constituents Reduce Seizure Behavior in Chemically-Induced and *Scn1a*-Mutant Zebrafish." *Epilepsy and Behavior* 110.
- Tiraboschi, Ettore, Silvia Martina, Wietske van der Ent, Kamil Grzyb, Kinga Gawel, Maria Lorena Cordero-Maldonado, Suresh Kumar Poovathingal, Sarah Heintz, Somisetty Venkata Satheesh, Jarle Brattespe, Ju Xu, Maximiliano Suster, Alexander Skupin, and Camila V. Esguerra. 2020. "New Insights into the Early Mechanisms of Epileptogenesis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome." *Epilepsia* 61(3):549–60.
- Tolete, Patricia, Kelly Knupp, Michael Karlovich, Elaine DeCarlo, Judith Bluvstein, Erin Conway, Daniel Friedman, Patricia Dugan, and Orrin Devinsky. 2018. "Lorcaserin Therapy for Severe Epilepsy of Childhood Onset." *Neurology* 91(18):837–39.

- Tomson, Torbjörn, Dina Battino, and Emilio Perucca. 2016. "The Remarkable Story of Valproic Acid." *The Lancet Neurology* 15(2):141.
- Tremblay, Marie Ève, Cynthia Lecours, Louis Samson, Víctor Sánchez-Zafra, and Amanda Sierra. 2015. "From the Cajal Alumni Achúcarro and Río-Hortega to the Rediscovery of Never-Resting Microglia." *Frontiers in Neuroanatomy* 9(APR).
- Turrini, L., C. Fornetto, G. Marchetto, M. C. Müllenbroich, N. Tiso, A. Vettori, F. Resta, A. Masi, G. Mannaioni, F. S. Pavone, and F. Vanzi. 2017. "Optical Mapping of Neuronal Activity during Seizures in Zebrafish." *Scientific Reports* 7(1):3025.
- Vacaru, Ana M., Gokhan Unlu, Marie Spitzner, Marina Mione, Ela W. Knapik, and Kirsten C. Sadler. 2014. "In Vivo Cell Biology in Zebrafish - Providing Insights into Vertebrate Development and Disease." *Journal of Cell Science* 127(3):485–95.
- Vale, Allister and Marcello Lotti. 2015. "Organophosphorus and Carbamate Insecticide Poisoning." Pp. 149–68 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 131. Elsevier B.V.
- Vale, Allister, Timothy C. Marrs, and Paul Rice. 2016. "Chemical Terrorism and Nerve Agents." *Medicine (United Kingdom)* 44(2):106–8.
- Varvel, Nicholas H., Jonas J. Neher, Andrea Bosch, Wenyi Wang, Richard M. Ransohoff, Richard J. Miller, and Raymond Dingledine. 2016. "Infiltrating Monocytes Promote Brain Inflammation and Exacerbate Neuronal Damage after Status Epilepticus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(38):E5665–74.
- Velioglu, Sibel K., C. Boz, and M. Özmenoğlu. 2005. "The Impact of Migraine on Epilepsy: A Prospective Prognosis Study." *Cephalalgia* 25(7):528–35.
- Vermoesen, Katia, Ann Sophie K. Serruys, Ellen Loyens, Tatiana Afrikanova, Ann Massie, Anneleen Schallier, Yvette Michotte, Alexander D. Crawford, Camila V. Esguerra, Peter A. M. de Witte, Ilse Smolders, and Ralph Clinckers. 2011. "Assessment of the Convulsant Liability of Antidepressants Using Zebrafish and Mouse Seizure Models." *Epilepsy and Behavior* 22(3):450–60.
- Vezzani, Annamaria, Eleonora Aronica, Andrey Mazarati, and Quentin J. Pittman. 2013. "Epilepsy and Brain Inflammation." *Experimental Neurology* 244:11–21.
- Vezzani, Annamaria, Silvia Balosso, and Teresa Ravizza. 2019. "Neuroinflammatory Pathways as Treatment Targets and Biomarkers in Epilepsy." *Nature Reviews Neurology* 15(8):459–72.
- Vezzani, Annamaria, Jacqueline French, Tamas Bartfai, and Tallie Z. Baram. 2011. "The Role of Inflammation in Epilepsy." *Nature Reviews Neurology* 7(1):31–40.
- Vezzani, Annamaria, Teresa Ravizza, Silvia Balosso, and Eleonora Aronica. 2008. "Glia as a Source of Cytokines: Implications for Neuronal Excitability and Survival." Pp. 24–32 in *Epilepsia*. Vol. 49.
- Villas, Nicole, Mary Anne Meskis, and Sue Goodliffe. 2017. "Dravet Syndrome: Characteristics, Comorbidities, and Caregiver Concerns." *Epilepsy and Behavior* 74:81–86.
- Vinet, Jonathan, Hilmar R. J. van Weering, Annette Heinrich, Roland E. Kälin, Anja Wegner, Nieske Brouwer, Frank L. Heppner, Nico van Rooijen, Hendrikus W. G. M. Boddeke, and Knut Biber. 2012. "Neuroprotective Function for Ramified Microglia in Hippocampal Excitotoxicity." *Journal of Neuroinflammation* 9.
- Viviani, Barbara, S. Bartesaghi, F. Gardoni, A. Vezzani, M. M. Behrens, T. Bartfai, M. Binaglia, E. Corsini, M. Di Luca, C. L. Galli, and M. Marinovich. 2003. "Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases." *Journal of Neuroscience* 23(25):8692–8700.
- Viviani, Barbara, Fabrizio Gardoni, and Marina Marinovich. 2007. "Cytokines and Neuronal Ion

- Channels in Health and Disease." *International Review of Neurobiology* 82:247–63.
- Vossel, Keith A., Maria C. Tartaglia, Haakon B. Nygaard, Adam Z. Zeman, and Bruce L. Miller. 2017. "Epileptic Activity in Alzheimer's Disease: Causes and Clinical Relevance." *The Lancet Neurology* 16(4):311–22.
- de Vries, Evelien E., Bart van den Munckhof, Kees P. J. Braun, Annet van Royen-Kerkhof, Wilco de Jager, and Floor E. Jansen. 2016. "Inflammatory Mediators in Human Epilepsy: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 63:177–90.
- Wager, Kim, Anselm A. Zdebik, Sonia Fu, Jonathan D. Cooper, Robert J. Harvey, and Claire Russell. 2016. "Neurodegeneration and Epilepsy in a Zebrafish Model of CLN3 Disease (Batten Disease)." *PLoS ONE* 11(6):1–24.
- Wallace, Adam, Elaine Wirrell, and Daniel L. Kenney-Jung. 2016. "Pharmacotherapy for Dravet Syndrome." *Pediatric Drugs* 18(3):197–208.
- Wang, Yan Qiu, Zhi Xu Fang, Yi Wei Zhang, Ling Ling Xie, and Li Jiang. 2020. "Efficacy of the Ketogenic Diet in Patients with Dravet Syndrome: A Meta-Analysis." *Seizure* 81:36–42.
- West, Siobhan, Sarah J. Nevitt, Jennifer Cotton, Sacha Gandhi, Jennifer Weston, Ajay Sudan, Roberto Ramirez, and Richard Newton. 2019. "Surgery for Epilepsy." *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Wheless, James W., Stephen P. Fulton, and Basanagoud D. Mudigoudar. 2020. "Dravet Syndrome: A Review of Current Management." *Pediatric Neurology* 107:28–40.
- Williams, W. Martin, Jeffrey M. Giddings, John Purdy, Keith R. Solomon, and John P. Giesy. 2014. "Exposures of Aquatic Organisms to the Organophosphorus Insecticide, Chlorpyrifos Resulting from Use in the United States." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 231:77–117.
- Wirrell, Elaine C., Linda Laux, Elizabeth Donner, Nathalie Jette, Kelly Knupp, Mary Anne Meskis, Ian Miller, Joseph Sullivan, Michelle Welborn, and Anne T. Berg. 2017. "Optimizing the Diagnosis and Management of Dravet Syndrome: Recommendations From a North American Consensus Panel." *Pediatric Neurology* 68:18-34.e3.
- Wirrell, Elaine C. and Rima Nabbout. 2019. "Recent Advances in the Drug Treatment of Dravet Syndrome." *CNS Drugs* 33(9):867–81.
- Wong, Jennifer C., Stacey B. B. Dutton, Stephen D. Collins, Steven Schachter, and Andrew Escayg. 2016. "Huperzine a Provides Robust and Sustained Protection against Induced Seizures in Scn1a Mutant Mice." *Frontiers in Pharmacology* 7(OCT).
- Wong, Keith, Adam Stewart, Thomas Gilder, Nadine Wu, Kevin Frank, Siddharth Gaikwad, Christopher Suci, John Dileo, Eli Utterback, Katie Chang, Leah Grossman, Jonathan Cachat, and Allan V. Kalueff. 2010. "Modeling Seizure-Related Behavioral and Endocrine Phenotypes in Adult Zebrafish." *Brain Research* 1348:209–15.
- Wu, Yvonne W., Joseph Sullivan, Sharon S. McDaniel, Miriam H. Meisler, Eileen M. Walsh, Sherian Xu Li, and Michael W. Kuzniewicz. 2015. "Incidence of Dravet Syndrome in a US Population." *Pediatrics* 136(5):e1310–15.
- Wyatt, Season K., Thomas Witt, Nicholas M. Barbaro, Aaron A. Cohen-Gadol, and Amy L. Brewster. 2017. "Enhanced Classical Complement Pathway Activation and Altered Phagocytosis Signaling Molecules in Human Epilepsy." *Experimental Neurology* 295:184–93.
- Xi, Yanwei, Sandra Noble, and Marc Ekker. 2011. "Modeling Neurodegeneration in Zebrafish." *Current Neurology and Neuroscience Reports* 11(3):274–82.
- Yang, Xue, Jia Lin, Xiaolan Peng, Qin Zhang, Yinglan Zhang, Ning Guo, Shuizhen Zhou, and Qiang

- Li. 2017. "Effects of Picrotoxin on Zebrafish Larvae Behaviors: A Comparison Study with PTZ." *Epilepsy and Behavior* 70:224–31.
- Yang, Yaxiong, Nan Liu, Yuanyuan He, Yuxia Liu, Lin Ge, Linzhi Zou, Sen Song, Wei Xiong, and Xiaodong Liu. 2018. "Improved Calcium Sensor GCaMP-X Overcomes the Calcium Channel Perturbations Induced by the Calmodulin in GCaMP." *Nature Communications* 9(1).
- Yu, Frank H., Massimo Mantegazza, Ruth E. Westenbroek, Carol A. Robbins, Franck Kalume, Kimberly A. Burton, William J. Spain, G. Stanley McKnight, Todd Scheuer, and William A. Catterall. 2006. "Reduced Sodium Current in GABAergic Interneurons in a Mouse Model of Severe Myoclonic Epilepsy in Infancy." *Nature Neuroscience* 9(9):1142–49.
- Zabinyakov, Nikita, Garrett Bullivant, Feng Cao, Matilde Fernandez Ojeda, Zheng Ping Jia, Xiao Yan Wen, James J. Dowling, Gajja S. Salomons, and Saadet Mercimek-Andrews. 2017. "Characterization of the First Knock-out Aldh7a1 Zebrafish Model for Pyridoxine-Dependent Epilepsy Using CRISPR-Cas9 Technology." *PLoS ONE* 12(10):1–14.
- Zhang, Ye, Kenian Chen, Steven A. Sloan, Mariko L. Bennett, Anja R. Scholze, Sean O’Keeffe, Hemali P. Phatnani, Paolo Guarnieri, Christine Caneda, Nadine Ruderisch, Shuyun Deng, Shane A. Liddelow, Chaolin Zhang, Richard Daneman, Tom Maniatis, Ben A. Barres, and Jia Qian Wu. 2014. "An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex." *Journal of Neuroscience* 34(36):11929–47.
- Zhang, Yifan, Angéla Kecskés, Daniëlle Copmans, Mélanie Langlois, Alexander D. Crawford, Bertien Ceulemans, Lieven Lagae, Peter A. M. de Witte, and Camila V. Esguerra. 2015. "Pharmacological Characterization of an Antisense Knockdown Zebrafish Model of Dravet Syndrome: Inhibition of Epileptic Seizures by the Serotonin Agonist Fenfluramine" edited by Y. Herault. *PLOS ONE* 10(5):e0125898.
- Zhao, Xiaofeng, Yuan Liao, Shannon Morgan, Ramkumar Mathur, Paul Feustel, Joseph Mazurkiewicz, Jiang Qian, Julia Chang, Gary W. Mathern, Matthew A. Adamo, Anthony L. Ritaccio, Michael Gruenthal, Xinjun Zhu, and Yunfei Huang. 2018. "Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy." *Cell Reports* 22(8):2080–93.
- Zheng, Wei, Natasha Thorne, and John C. McKew. 2013. "Phenotypic Screens as a Renewed Approach for Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 18(21–22):1067–73.
- Ziobro, Julie, Krista Eschbach, Joseph E. Sullivan, and Kelly G. Knupp. 2018. "Current Treatment Strategies and Future Treatment Options for Dravet Syndrome." *Current Treatment Options in Neurology* 20(12).

Titre : Contribution à l'étude des conséquences de l'épilepsie sur le développement cérébral et l'activité des cellules microgliales

Mots clés : Épilepsie; Microglie; Syndrome de Dravet; poisson zèbre; Synapses

Résumé :

L'épilepsie est une maladie neurologique qui touche plus de 50 millions de personnes dans le monde. Elle se caractérise par des crises récurrentes dues à la surexcitation synchrone et spontanée de populations neuronales du cerveau. Les crises sont de nature très variable et les symptômes dépendent de la zone du cerveau touchée et de son étendue. Le terme «troubles épileptiques» est par conséquent préféré. Ceux-ci peuvent avoir de nombreuses causes, soient génétiques (par exemple, le syndrome de Dravet, une épilepsie infantile rare, provoquée dans 80% des cas par la mutation hétérozygote du gène *SCN1A*), soient environnementales (par exemple, après un empoisonnement aux organophosphorés, des composés présents dans les pesticides et les agents de guerre neurotoxiques). Dans les deux cas, les traitements actuels ne permettent pas un contrôle optimal des crises. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces différentes formes d'épilepsie est donc nécessaire pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux anticonvulsivants.

Les cellules microgliales, les macrophages résidents du cerveau ont de nombreuses fonctions qui varient en fonction de la maturité du cerveau. Les microglies sont les gardiennes de l'homéostasie cérébrale, assurant en permanence le bon fonctionnement des neurones. Ce sont des cellules immunitaires capables de moduler leur activité en fonction des dangers qu'elles détectent. De plus, elles ont un rôle

particulier dans la plasticité synaptique et la modulation de l'excitabilité neuronale. Ces différents rôles ont suscité de nombreuses hypothèses sur l'implication de ces cellules dans la physiopathologie des troubles épileptiques. Pour certaines, les microglies sont nocives pour l'excitabilité des neurones, par leur activation et la sécrétion chronique de cytokines pro-inflammatoires. Pour d'autres, elles ont un rôle bénéfique, la microglie tamponnant l'hyperexcitabilité neuronale et diminuant ainsi la fréquence des crises.

L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier les mécanismes de l'épileptogenèse impliquant les cellules microgliales afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. J'ai développé deux modèles d'épilepsie chez le poisson zèbre, un modèle génétique du syndrome de Dravet et un modèle d'empoisonnement aux organophosphorés. Ceux-ci m'ont permis d'étudier les modifications du système nerveux central au cours de l'épileptogenèse. J'ai ainsi montré un déséquilibre de la balance exciteur/inhibiteur vers l'excitation qui pourrait déclencher des crises d'épilepsie. En utilisant le modèle de Dravet, j'ai également caractérisé les changements morphologiques, comportementaux et moléculaires des cellules microgliales après des crises. Ces travaux améliorent notre compréhension des conséquences des crises d'épilepsie dans le cerveau et contribuent à ouvrir la voie à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter différentes formes d'épilepsie.

Title: Contribution to the study of the consequences of epilepsy on brain development and microglial activity

Keywords: Epilepsy, Microglia, Dravet Syndrome, Zebrafish, Synapses

Abstract:

Epilepsy is a neurological disease affecting some 50 million people worldwide. It is characterized by recurrent seizures due to the synchronous and spontaneous overexcitation of neuronal populations in the brain. Seizures vary widely in nature, and symptoms depend on the area of the brain affected and its extent. The term 'epileptic disorders' is accordingly preferred. These can have many causes, including both genetic (e.g. Dravet syndrome, a rare infantile epilepsy caused in 80% of cases by the heterozygous mutation of the *SCN1A* gene), and environmental (e.g. after poisoning with organophosphates, compounds present in pesticides and neurotoxic warfare agents). Whether for Dravet syndrome or organophosphate poisoning, current treatments do not enable optimal control of seizures. A better understanding of the pathophysiology of these different forms of epilepsy is thus needed to find new therapeutic targets and new anticonvulsants.

Microglial cells are the resident macrophages in the brain. These cells have many functions, which can vary depending on the maturity of the brain. The microglia are the guardians of cerebral homeostasis, continuously ensuring the proper functioning of neurons. They are immune cells able to modulate their activity according to the dangers they detect. In addition, microglia have a special role in synaptic plasticity

and the modulation of neuronal excitability. These different roles have prompted numerous hypotheses on the involvement of these cells in the pathophysiology of epileptic disorders. In some, microglia are harmful for the excitability of neurons, through their activation and the chronic secretion of pro-inflammatory cytokines. Others lend them a beneficial role, with microglia buffering neuronal hyperexcitability and thus decreasing the frequency of seizures.

The objective of my PhD work was to study the mechanisms of epileptogenesis involving microglial cells in order to identify new therapeutic targets. I developed two models of epilepsy in zebrafish, a genetic model of Dravet syndrome and a model of organophosphate poisoning. These enabled me to study the modifications of the central nervous system during epileptogenesis. I specifically demonstrated an excitatory /inhibitory imbalance toward excitation that could trigger epileptic seizures. Using the Dravet model, I also successfully characterized the morphological, behavioral and molecular changes of microglial cells after seizures. This work improves our understanding of the consequences of epileptic seizures in the brain and helps pave the way for the discovery of new therapeutic targets to treat different forms of epilepsy.