Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Florent MARTY

Le 5 juillet 2021

Cassures double-brin de l'ADN des neurones : un rôle commun dans la physiopathologie de l'infection par le Bornavirus et l'inflammation chronique

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Unité de recherche :
INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

Thèse dirigée par
Elsa SUBERBIELLE

Jury

Mme Monique LAFON, Rapporteure
Mme Sophie LAYE, Rapporteure
M. Pierre GRESSENS, Rapporteur
M. Roland LIBLAU, Examinateur
Mme Elsa SUBERBIELLE, Directrice de thèse

Préambule

« Que diable allait-il faire dans cette galère ? »
Géronte dans Les Fourberies de Scapin (Molière)

C'est par ces mots que beaucoup, autant moldus que mordus de sciences, parlent des futurs docteurs. Pour ma part, cela aura été une extraordinaire expérience et je n'en garderai que de très bons souvenirs. Le parcours a été semé d'embuches mais, au final, j'ai pu travailler sur des notions que je ne pensais pas explorer. Ce projet « bicéphale » m'a permis de revenir à mes premiers amours de neuro de licence mais, cette fois-ci, de façon un peu plus approfondie avec les tests comportementaux. Heureusement, j'ai été guidé dans ce nouveau monde par deux spécialistes qui ont su me donner les astuces, pour mieux appréhender cette discipline.

Louis Pasteur écrivait dans ses notes en 1858 : « Si l'on cherche à se rendre compte de son origine [de la découverte scientifique], si l'on suit avec rigueur les progrès de la science dans ce qui s'y rapporte, on est frappé de la lenteur avec laquelle elle a pris naissance. Elle n'est jamais l'œuvre d'un seul homme et chacun de ceux qui y ont concouru lui ont donné bien des veilles ». Je ne sais pas de quoi l'avenir sera fait pour ma carrière scientifique mais, j'aurai eu plaisir à ajouter ma pierre à l'édifice de la « découverte scientifique » et d'avoir participé à mieux comprendre des mécanismes nouveaux et originaux.

J'ai souhaité, lorsque j'ai rédigé mon manuscrit de thèse, que le lecteur, par des illustrations simples et claires, ait un complément adapté au discours qu'il lisait. « Une image vaut mille mots » disait Confucius, c'est pourquoi, j'ai eu le désir de réaliser et concevoir une très grande majorité de mes figures.

J'espère que la lecture de mon manuscrit, « résumé » de mes quatre années à travailler sur ce projet, apportera le même plaisir que j'ai eu à le rédiger.

« Il est bon de tout remettre en question, chaque jour. »
Francis BLANCHE

B

Résumé

Plusieurs situations pathologiques, comme certaines maladies infectieuses ou inflammatoires, conduisent à des perturbations de la fonction neuronale ou à des troubles du comportement et de la cognition. L'origine de ces perturbations est complexe et mal comprise, mais nous savons qu'elles sont liées à des modifications de l'épigénétique neuronale. Récemment, les cassures double-brin (CDB) de l'ADN ont été identifiées comme un régulateur central de l'épigénétique neuronale. Il est désormais établi que l'équilibre entre la production de CDB, suite à l'activité neuronale, et leur réparation efficace garantissent le bon fonctionnement des neurones. Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à étudier l'impact d'une infection virale ou de la neuroinflammation sur cet équilibre et d'analyser les conséquences sur le fonctionnement neuronal et le comportement.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'infection neuronale par le Bornavirus (BoDV). Ce virus neurotrope à ARN négatif simple brin persiste dans le système nerveux sans induire de mort neuronale. Une autre originalité du BoDV est qu'il se réplique dans le noyau, en étroite interaction avec la chromatine cellulaire. Nos résultats montrent que l'infection de cultures de neurones primaires de rat par le BoDV augmente le taux de CDB. Nous avons également découvert que les CDB servent de plateforme pour l'assemblage des usines de réplication virales, favorisant ainsi la réplication du virus. Par ailleurs, les neurones infectés par le BoDV présentent une activité électrique spontanée réduite et un défaut de réponse à la stimulation de la neurotransmission. Ces perturbations sont liées à la perte de l'expression en surface des neurones de récepteurs au neurotransmetteur glutamate impliqués dans la plasticité neuronale et la production de CDB. Nos résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme inédit de "rétrocontrôle" de la réplication virale, qui, en inhibant la production de CDB dépendantes de l'activité, favoriserait la persistance.

Indépendamment des infections virales, des troubles neurologiques sont également observés lors de la neuroinflammation chronique. Nous nous sommes demandés si les troubles neurologiques, observés lors de la neuroinflammation chronique, ne pouvaient pas également être liés à une perturbation des CDB. Dans des cultures primaires de neurones de souris, nous avons mis en évidence que l'interleukine-1β (IL-1β), une des principales cytokines de la neuroinflammation, augmentait les niveaux de CDB. Afin d'étudier le comportement de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β, nous avons mis en place une plateforme dédiée disposant

de tests permettant d'évaluer la mémoire et l'anxiété. *In vivo* chez la souris, nous avons montré que l'infusion chronique de cette cytokine à l'aide de mini-pompes osmotiques implantées sous la peau perturbe la mémorisation spatiale dépendant de l'hippocampe et augmente le nombre de neurones présentant des CDB dans cette structure cérébrale. Enfin, nous avons montré, à l'aide de modèles conditionnels et inductibles de souris transgéniques, que le blocage de la signalisation médiée par l'IL-1β, ou par les CDB, prévient les effets délétères de l'IL-1β sur la mémorisation.

Ces travaux ont permis de mieux comprendre comment les fonctions cognitives peuvent être altérées en conditions pathologiques, et pourraient conduire, à terme, à identifier les facteurs clés qui les régulent.

Mots clés : Neurone, Épigénétique, Virus, Inflammation, Comportement

Abstract

Viral infections and inflammation disrupt neuronal function, leading to behavioral and cognitive deficits. Although the underlying mechanisms remain to be fully uncovered, we already know that these pathological conditions impair neuronal epigenetics. Recently, DNA double-strand breaks (DSB) have been identified as un central regulator of neuronal epigenetic. In non-pathological conditions, neuronal activity induces the generation of DSB, which are quickly and efficiently repaired. The balance between DSB production and repair ensures a proper functioning of neurons. In this context, my Ph.D. project consisted in studying the impact of a viral infection or neuroinflammation on this balance and analyze their contribution of the latter on neuronal function or behavior.

First, we studied the neuronal infection by the Borna disease virus (BoDV). This negative single stranded RNA neurotropic virus persists in the nervous system without inducing neuronal death. BoDV is singular as it replicates in the nucleus, in close interaction with cellular chromatin. We showed that BoDV infection increases DSB levels in primary cultures of rat neurons. We also discovered that DSB are used as platforms for the assembly of viral factories, thereby promoting viral replication. In addition, BoDV-infected neurons display reduced spontaneous electrical activity and impaired response to the stimulation of neurotransmission. At the molecular level, these alterations are linked to a loss of surface expression of the receptor to neurotransmitter glutamate, a receptor which is critically involved in neuronal plasticity and DSB production. Altogether, our results suggest the existence of a novel feedback loop mechanism to control viral replication, by inhibiting the induction of activity-dependent DSB to promote BoDV persistence.

Independently of viral infections, neurological impairments are also observed in the course of chronic neuroinflammation. We asked whether the neurological symptoms that accompany chronic neuroinflammation may, in fact, result from alterations in DSB levels. In primary cultures of mouse neurons, we showed that interleukin-1β (IL-1β), one of the main proinflammatory cytokines in neuroinflammation, increase DSB levels in neurons. In order to study mouse behavior upon chronic treatment by IL-1β, we have implemented an in-house behavioral core facility allowing for testing memory- and anxiety-related behaviors. We then carried out experiments of chronic exposure of mice to IL-1β, using subcutaneously-implanted osmotic minipumps. We showed that IL-1β treated-mice exhibit a lack of hippocampal

dependent-spatial memory, accompanied by increased numbers of neurons with DSB in the hippocampus. Finally, thanks to conditional and inducible transgenic mouse models, we showed that knocking-out neuronal signaling pathways mediated by IL-1β, or by DSB, prevent IL-1β-dependent deleterious impact on memory.

In conclusion, our work provides a better understanding of how, under pathological conditions, cognitive functions can be disrupted, and will allow ultimately, the identification of key factors of the regulatory processes of these mechanisms.

Keywords: Neuron, Epigenetics, Virus, Inflammation, Behavior

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr. Monique LAFON, le Dr. Sophie LAYE et le Pr. Pierre GRESSENS de m'avoir fait l'honneur d'accepter de lire et d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je les remercie, par avance, des futurs échanges que nous aurons au cours de la lecture de mon manuscrit mais également lors de la soutenance de thèse, qui seront, je n'en doute pas, d'une grande richesse. Je souhaite également remercier le Pr. Roland LIBLAU d'avoir accepté de présider mon jury, et de l'ensemble des remarques et conseils qu'il m'a donnés, tout au long de ma thèse, lors des différentes réunions d'Institut auxquelles j'ai pu présenter. Je remercie également le Pr. Dominique GARCIN et le Dr. Cédrick FLORIAN, membres de mon comité de thèse pour m'avoir donné leurs avis et pour les échanges durant les différents comités. Je remercie les autres membres de mon comité, le Dr. Nicolas BLANCHARD et mon parrain de thèse le Dr. Bernard LAGANE d'avoir été à l'écoute de mes doutes ou de mes questionnements.

« Chef », « mon général », **Daniel**, je vous remercie encore de m'avoir accueilli dans votre équipe durant tout ce temps ! Vous avez su déceler en moi ce petit quelque chose lors d'une entrevue pour un stage de M1 et vous avez décidé de me garder (trop) longtemps. Enfin, je ne sais pas si c'est vrai, mais cela fait toujours du bien au moral de penser que l'on a un petit « truc » en plus ! Je vous remercie pour m'avoir guidé vers ce qu'il se faisait de mieux en Virologie et de m'avoir proposé le M2 de Virologie Fondamentale à l'Institut Pasteur. Grâce à vous, j'ai vraiment trouvé ce qui me plaisait et je me suis épanoui dans cette formation. Je crois que la Virologie est faite pour moi et c'est aussi vous qui m'avez entretenu cette flamme de la passion de la Virologie à travers nos échanges. Merci pour vos conseils sur l'écriture d'articles ou de rapports, et sur l'art de la présentation orale et des TRANSITIONS ! J'espère qu'elles seront parfaites le jour J… Je ne sais pas si vous vous souvenez, mais un jour nous avions fait un pari : si vous mangiez McDonald's, je vous tutoyais. En attendant le Big Mac, je prends un peu d'avance en **TE** remerciant encore une fois infiniment pour tout **TON** soutien durant toutes ces années ! PS : Cambounet sur le Sor, c'est sans les tirets.

Elsa, le jeune rémora est devenu « padawan », puis le padawan est devenu grand ! Il va maintenant quitter le nid et voir s'il fait bon, aussi ailleurs ! De maître de stage tu es devenue ma co-directrice et finalement ma directrice de thèse ! Finalement, tu as grandi en même temps que moi… Mais au niveau au-dessus ! Nous avons développé ensemble la base des projets qui allait servir quelques années après, pour le groupe « Neuro » ou le « B414 » pour les intimes. J'ai été ton premier thésard, nous avons essuyé les plâtres ensemble et je pense que l'on s'en sort pas mal ! Je pourrais écrire deux pages pour détailler en quoi et pourquoi je te remercie, mais comme tu le dis si bien : « Va à l'essentiel ! », alors… Merci de m'avoir accompagné durant tout ce temps. Au début, tu as exploré toutes les options possibles pour me trouver un financement de thèse, pour me garder, mais dans le malheur de certaines désillusions, la lumière est venue d'Allemagne avec Boehringer Ingelheim Fonds. Merci de m'avoir guidé dans le labyrinthe (et pas l'EPM) que sont les neurosciences. Tu as su être très pédagogue pour combler mes manques et m'enseigner quelques rudiments dans ce domaine. Merci aussi pour tes judicieux conseils pour les présentations orales. Je pense qu'entre toi et Daniel, nous ne pouvons pas être mieux formés à faire des présentations. Je me souviens qu'un jour tu m'as dit : « tu verras, toute façon à la fin de ta thèse on sera fâché, ça se passe toujours comme ça les thèses ! ». Je ne sais pas de ton côté mais pour moi… Beh ça va très bien ! Merci pour tout !

Karine, Loulou, tu es arrivée au labo presque en même temps que lorsque j'ai démarré ma thèse. Tu es venue squatter le B418 que nous nous étions appropriés avec Anne. Nous étions loin d'imaginer comment les relations allaient évoluer… Nous t'avons jugée au départ, évidemment ! Mais pas longtemps, juste 4-5 mois… Puis, nous sommes devenus presque fusionnels ! Je te remercie pour les grands moments de rigolade que nous avons eus lorsque nous nous faisions dos dans le bureau. Nous étions collègues, nous sommes devenus amis et nous le resterons ! Merci bien-sûr pour tout ce que nous avons pu échanger d'un point de vue scientifique, même si ce n'était pas l'objet de 98 % de nos discussions. J'ai eu l'occasion de te dire tout ce que je pensais dans la lettre que je t'ai donnée pour ton pot de départ. Mais tu es revenue, alors bon… Je ne vais pas faire des lettres de pot de départ tous les mois ! Tu sais tout ce que je pense de toi, nous n'avons plus besoin de communiquer ! Juste pour être sûr quand même, promets-moi que nous resterons en contact, toujours ;-). Comme dirait Andrea Boccelli « *Vivo per lei !* ».

Anne, je ne savais pas à qui attribuer cette anecdote alors je vais la mettre ici. Quand nous nous sommes rencontrés la première fois, j'ai longtemps hésité à venir dans ton bureau, malgré moi, car j'ai été déplacé de bureau en bureau, 2 ou 3 fois, avant de finalement arriver à ce qui aller être ma deuxième maison pour les années à venir. Tu as toujours été là lorsque j'avais besoin de toi, toujours disponible pour répondre à une de mes questions ou discuter de la vieille chimie de laboratoire. Une vraie deuxième « maman » finalement ! Si j'ai persisté à rester ici pour ma thèse c'est aussi parce que je me sentais bien avec toi et Karine dans ce B418. Merci pour ta bonne humeur constante, toujours le sourire, et pour ta générosité. Encore une fois je ne suis pas hyper doué pour les remerciements, je vous le dis aussi bien de vive voix. Tes cannelés et tes petites saucisses piquantes vont me manquer… Mais je reviendrai en prévenant un peu avant pour anticiper la préparation ! J'ai aussi passé de très belles années grâce à toi et on ne peut rêver mieux comme collègue !

Fred, Yami, Mathilde et Benjamin, mes co-thésards.

Fred, la dernière thésarde arrivée, des débuts difficiles mais je suis sûr que ça va le faire ! Tu as un super projet ! J'ai été super content de te rencontrer ! Tu es hyper drôle et très sympathique ! Peu importe où je serai demain, tu as mon code ami, on se fait un Mario Kart sur la Switch quand tu veux !

Thank you Yami, we couldn't go to take a beer or a glass of wine enough cause of COVID-19… I hope the end of your PhD will be the best!

Mathilde, merci pour ta gentillesse et pour ta franchise quand il fallait me dire des choses. Merci également pour tes conseils après mes présentations, tu as toujours su trouver le petit conseil en plus qui pouvait tout changer. Tu as toujours été à l'initiative de sorties entre thésards, encore une fois COVID nous a coupé l'herbe sous le pied… Dommage, on aurait eu des opportunités de mettre en place plein de plans à pas piquer des hannetons. Je te passe le flambeau du thésard « sénior » et je te ferai passer également le plan de mes stocks cachés de réactifs communs ;-) Bonne fin de thèse !

Benjamin, mon co-thésard du B414, cela aura été un plaisir de travailler avec toi sur le gros projet « cytokine/comportement », avec Charlotte également. Malgré que nous ayons des tempéraments très opposés, nous nous sommes très bien complétés par nos compétences. Tu as su apporter ta grande expertise des neurosciences et nous faire profiter de tes idées pour construire la pièce comportement. Nous te devons beaucoup pour cela ! Merci aussi pour nos grandes discussions préprandiales de 19 h. Je crois que nous avons parlé de tout, d'éthique expérimentale, de visions des tests de comportements, de sémantique, de philosophie des

sciences, etc… Un vrai régal ! Il manquait juste un petit Whisky et un peu de Mozart. Merci également pour tes petites attentions qui font toujours plaisir et l'aide que tu m'as apporté.

Les autres membres de la famille ViNeDys, **Cécile, Hélène, Charlotte**.

Merci Cécile de m'avoir fait entrer dans l'équipe, parce que c'est aussi grâce à toi ! Tu as également été toujours de très bons conseils quand je suis venu te solliciter. La Force tranquille ! J'ai adoré l'expérience de moniteurs de TP/TD de Virologie que j'ai eu avec toi. Merci de m'avoir guidé dans ce nouveau monde qu'était l'enseignement en Université. J'ai pris beaucoup de plaisirs à préparer les supports, les TP et juste partager et parler de virus avec les étudiants. Merci pour tout !

Hélène, je crois que tu es mon double féminin de l'humour. Nous avons (malheureusement) passé un cap qui fait que certaines blagues que nous faisons ne peuvent être comprises que par nous. Merci pour ta bonne humeur, pour les mimes, les « costumes » et nos séquences Nostalgie à la radio du L2. Sur un plan plus professionnel, oui merci pour tout aussi… Bref, finalement on ne se souviendra que du versant « extra-scientifique » ! Merci Natasha Gouriskaya, équipe 18 !

Charlotte, tu es arrivée dans l'équipe et tu as « tué le *game* », comme disent les jeunes, quand tu as développé tes logiciels de *tracking* des souris. Merci en tout cas pour toute l'aide que tu m'as fourni pour les données des expériences de comportement et les analyses avec les logiciels que tu as mis au point. Merci pour ta bonne humeur, ta positivité omniprésente et pour arriver à mater trois mecs dans le bureau !

Raphaël, tu es le dernier arrivé dans l'équipe ! Tu t'es présenté à nous lors des entretiens comme mi belge, mi bordelais. Alors, tu comprends bien que mon vote s'est porté sur ta concurrente à l'entretien. Finalement, c'est toi qui as été choisi. Je ne m'attendais à rien et puis j'ai été déçu de voir que je m'étais trompé ! Merci Raph pour ta sympathie et ta positivité ! Je me suis vite entendu avec toi, tu as été réceptif à mes mauvaises blagues alors forcément on ne pouvait que s'entendre. Merci pour tous tes conseils et des échanges que nous avons eu sur presque tout, en si peu de temps.

Merci à tous les stagiaires de l'équipe avec qui j'ai pu interagir et travailler. Merci à **Camille** et **Mathilde Jr** pour leur sérieux et leur bonne humeur. Vous irez, ou vous êtes en train, d'aller loin ! (Sauf peut-être une mais je ne dirai pas laquelle… ;-))

Merci à la team du 4ème étage, **Marie, Ana, Philippe, Quentin, Vincent**, nous avons été voisins de palier. Je m'excuse encore du désagrément pour les nuisances sonores que nous avons pu causer… C'est toujours un plaisir d'échanger avec vous, autour d'un café, d'une bière, d'un verre de vin. Nous n'aurons pas eu le temps de profiter de cette dernière année, mais ce n'est que partie remise ! RDV le jour de nos soutenances de thèse ! Je vous passe le flambeau des décorations de Noël du 4ème. N'oubliez pas la règle : tous les ans, un peu plus ! On a un rang à tenir ;-).

Merci à la team du CU, **Arantxa et Nicolas**, cela a été un plaisir de réaliser cette mission avec vous. Je pense que grâce à nous, certaines choses ont pu bouger. Merci également de tout ce que nous avons pu faire lors des soirées jeux. Ce satané COVID nous a cassé notre élan, on était à deux doigts d'organiser les « Olympiades du CPTP » sur 2 jours… Tant pis…

Merci à tous les thésards, post-docs, chercheurs, ingénieurs, agents des services techniques que j'ai pu croiser durant mon séjour (cela fait un peu club FRAM) ici. D'une façon ou d'une autre, vous avez contribué à mon épanouissement personnel ou professionnel.

Merci à la bande de Pasteur ! **Nicolas, Val, Salomé, Héloïse**, grâce à vous, mon séjour à Paris durant ces quelques mois de Master a été génial ! Vous avez su rapidement m'intégrer à votre mode de vie, vos coutumes, votre langue, votre terroir. J'ai vraiment fait de très belles rencontres durant ce Master. C'est toujours un plaisir d'encore être quotidiennement en contact avec vous ! Comme quoi, il ne peut suffire que de quelques mois pour forger des amitiés très fortes et durables. Comme je vous l'ai dit, si j'avais pu, je serais bien resté l'année entière de Master sur Paris, plutôt que de rentrer trois mois et demi après, faire mon stage à Toulouse. J'espère vivement que nous resterons encore très longtemps en contact. Il ne tient qu'à nous d'entretenir la flamme !

Merci à la bande d'Albi, de Champollion ! **Céline, Anaïs et Geoffroy, Marie et Jacky, Claire, Arthur, Armand, Yoann, Émeline, Pierrick et MD, Floriane, Kevin.** Nous avons presque tous commencé nos années Facs (pas le cytomètre) ensemble. Dommage que la vie ait fait que les ponts soient coupés avec certains d'entre vous. J'espère cependant tous pouvoir vous revoir un jour ! Merci à tous ceux que je vois encore et à bientôt pour un barbeuc ! Albi c'est aussi **Elsa, Jenny, Delphine** et **Marie-Hélène**, la *dream team* de la biologie-chimie de

Champollion. J'ai passé de très belles années avec vous et il me tarde déjà de vous revoir, ma thèse à la main !

Merci à la bande de Toulouse, membres (ou non) du **Quorum sensing** ou **« QS »**, **Nelson** (Grand Sensor)**, Lloyd** (CDA : Chef Des Armées)**, Manon, Margaux, Danièle** (Service Costumes et Uniformes). Nous n'avons pas fini d'écrire l'Histoire de ce mouvement car l'Histoire est encore en marche ! Dieu (Nelson) seul sait quand celle-ci s'arrêtera !

Merci à la bande de Cambou, **Damien, Lucas, Hugo et Ophélie**, amis de la première heure, amis d'enfance. Nous pouvons dire que nous avons fait beaucoup de choses ensemble ! C'est toujours un plaisir de vous retrouver les WE pour le badminton, pour des après-midi (soirées) jeux, pour des matchs du VI Nations, ou pour l'organisation d'un évènement pour la commune !

Merci à **Boehringer Ingelheim Fonds** d'avoir financé mes travaux de thèse. Je les remercie pour leur accompagnement sans failles et les séminaires organisés dans les Alpes autrichiennes ou dans la campagne allemande. Merci pour la richesse des échanges qu'ils peuvent générer entre les différents thésards financés à travers le monde.

Je remercie également **LV** et **GL**, sans qui je n'aurais pas pu obtenir ce prestigieux financement.

Merci à toute ma famille pour m'avoir soutenu et encouragé durant tout mon cursus universitaire. Merci de m'avoir accompagné dans chacune de mes décisions ou de mes choix.

Florence, je te remercie de m'avoir soutenu durant toute cette longue période où j'étais présent mais sans être vraiment là. Merci d'avoir été à mes côtés pour me remotiver quand j'avais des petits moments de faiblesse ou des pertes d'inspiration.



Table des matières

PREAMBULE ..... A

RESUME C

ABSTRACT ..... E

REMERCIEMENTS ..... G

TABLE DES MATIERES ..... M

TABLE DES FIGURES ..... Q

LISTE DES ABREVIATIONS ..... S

INTRODUCTION 1

I. LE CERVEAU, LA MEMOIRE ET LEUR PLASTICITE 1

1. LE CERVEAU EST LE SIEGE DE LA MEMOIRE 1

1.1. Le système nerveux et les neurones 1

1.2. La mémoire 3

2. LE CERVEAU : UN ORGANE QUI S'ADAPTE 7

2.1. Le concept de la plasticité neuronale 7

2.2. Le rôle central des NMDAR dans la plasticité neuronale 9

2.3. La plasticité neuronale à l'échelle du réseau neuronal 11

II. EPIGENETIQUE ET PLASTICITE NEURONALE 13

1. GENERALITES 15

1.1. Le concept d'épigénétique 15

1.2. Structure de la chromatine 17

1.2.1. Le nucléosome 17

1.2.2. Euchromatine et hétérochromatine 19

2. LES ACTEURS EPIGENETIQUES DANS LA PLASTICITE NEURONALE 21

2.1. Les modifications post-traductionnelles des histones 21

2.1.1. Les mécanismes du « code » des histones 21

2.1.2. Les modifications d'histone dans la physiopathologie neuronale 23

2.2. Méthylation et déméthylation de l'ADN 25

2.2.1. Présentation des mécanismes 25

2.2.2. Les modifications de l'ADN dans la physiopathologie neuronale 27

2.3. L'interférence de l'expression génique par les ARNnc 29

2.3.1. Les différents mécanismes d'interférence de l'expression génique 29
2.3.2. Les contributions des ARNnc à la physiopathologie neuronale 31
3. LES CASSURES DOUBLE-BRIN : NOUVEAUX ACTEURS EPIGENETIQUES 33
3.1. Les cassures double-brin 33
3.1.1. De la génération à la réparation 35
3.1.2. Les cassures double-brin, un mécanisme épigénétique ? 41
3.2. Un rôle essentiel dans le fonctionnement des neurones 47
3.2.1. Les cassures double-brin neuronales : délétères mais pas que ! 47
3.2.2. L'équilibre cassure double-brin/réparation : essentiel pour les fonctions neuronales 47
3.2.3. Les cassures double-brin neuronales en conditions pathologiques 51
III. LE BORNAVIRUS : UN MODELE UNIQUE POUR L'ETUDE DES CASSURES DOUBLE-BRIN NEURONALES 55
1. PRESENTATION GENERALE 57
1.1. Histoire et taxonomie 57
1.2. Du génome à la structure de la particule 61
2. CYCLE DE REPLICATION 63
2.1. Tropisme 63
2.2. Adsorption et entrée du virus 63
2.3. Expression des protéines virales et réplication 65
2.3.1. Transcription 65
2.3.2. Traduction 67
2.3.3. Réplication 67
2.4. Assemblage et dissémination 67
2. LE VSPOT : UNE STRUCTURE CLE DANS LA REPLICATION DU BODV 69
2.1. Interaction avec la chromatine 69
2.2. Une usine bien organisée 71
3. EPIDEMIOLOGIE 73
3.1. Vie sauvage et animaux domestiques 75
3.2. Le BoDV : un virus au potentiel zoonotique 75
4. DE L'INFECTION A LA MALADIE : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE BORNA 77
4.1. Voie d'infection 77
4.2. Signes cliniques 79
4.3. Modèles d'étude 79
4.3.1. *In vivo* : le modèle du rat 81
4.3.2. *In vitro* : des lignées cellulaires à la culture primaire 83
4.4. Le BoDV, un virus persistant 85
4.5. Impact de l'infection sur la physiologie neuronale 87
4.5.1. Protection contre le stress oxydatif 89

4.5.2. Effets sur les voies de signalisation 89
4.5.3. Effets sur les vésicules synaptiques 93
4.5.4. Effets sur l'activité neuronale 93
4.5.5. Effets sur l'épigénétique neuronale 95

IV. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LA NEUROINFLAMMATION 99

1. L'INFLAMMATION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL 99
1.1. Le concept de la neuroinflammation 101
1.1.1. La barrière hémato-encéphalite : une barrière sélective 101
1.1.2. Inflammation périphérique et neuroinflammation centrale 103
1.2. Les acteurs locaux de la neuroinflammation 107
1.2.1. La microglie 107
1.2.1. Les astrocytes 109
1.2.2. Les neurones et les oligodendrocytes : un rôle immunomodulateur 111
2. LA NEUROINFLAMMATION : IMPACT SUR LE COMPORTEMENT 113
2.1. La neuroinflammation aiguë et le sickness behavior syndrome 113
2.1.1. Le *sickness behavior syndrome* 113
2.1.1. Etudier le *sickness behavior syndrome* : modèles et tests comportementaux 115
2.2. La neuroinflammation chronique 119
2.2.1. Du *sickness behavior syndrome* à la dépression 119
2.2.1. Neuroinflammation chronique et mémoire 121
3. L'INTERLEUKINE-1B DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL 127
3.1. Généralités 129
3.1.1. La famille des interleukines-1 129
3.1.2. L'IL-1β et ses récepteurs dans le cerveau 131
3.2. L'IL-1β, amie ou ennemie ? 135
3.2.1. Les effets positifs de l'IL-1β 135
3.2.2. Les effets négatifs de l'IL-1β 139
3.2.3. Cytokines pro-inflammatoires et épigénétique neuronale 147

OBJECTIFS DE LA THESE 149

RESULTATS 153

I. ROLES ET PERTURBATIONS DES CASSURES DOUBLE-BRIN DANS L'ADN DE NEURONES INFECTES PAR LE BODV 153

II. ROLES ET PERTURBATIONS DES CASSURES DOUBLE-BRIN DANS LES TROUBLES DU COMPORTEMENT ASSOCIES A L'INFUSION CHRONIQUE D'IL-1β 197

1. MATERIEL ET METHODES 201
1.1. Analyses comportementales après traitement chronique à l'IL-1β 201
1.2. Analyse des tissus prélevés chez les souris 207
1.3. Expériences in vitro 211
2. RESULTATS 215
2.1. L'IL-1β et l'IL-6 augmentent les niveaux de cassures double-brin dans des de neurones primaires d'hippocampe de souris 215
2.2. L'infusion chronique par de l'IL-1β systémique conduit à des défauts de mémoire et à l'accumulation de cassures double-brin dans l'hippocampe de souris sauvages 215
2.3. La déficience du récepteur IL-1R1 prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β 223
2.4. La déficience du variant d'histone H2A.X prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β 227

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 231

I. CONCLUSION GENERALE 231

II. DISCUSSION 235

1. LES CASSURES DOUBLE-BRIN : L'ACCELERATEUR ET LE FREIN DE LA REPLICATION DU BODV ? 235
2. LA PERTURBATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN PAR L'INTERLEUKINE-1B, A L'ORIGINE DE TROUBLES DU COMPORTEMENT ? 247
3. DEUX INDUCTEURS DIFFERENTS PERTURBENT LES CASSURES DOUBLE-BRIN, OÙ SONT CES CASSURES ? 259

III. PERSPECTIVES 261

BIBLIOGRAPHIE 267

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique des populations résidant dans le système nerveux central..... 0
Figure 2 : Schéma de la transmission de l'influx nerveux au niveau d'une synapse chimique..... 2
Figure 3 : Le système limbique et l'hippocampe : rôle dans la mémoire à long terme et organisation..... 4
Figure 4 : Schéma des voies de signalisation activées après stimulation des différents récepteurs au NMDA neuronaux, en fonction de leur localisation..... 10
Figure 5 : Schéma de l'assemblage des nucléosomes..... 18
Figure 6 : Modèle de compaction de la chromatine..... 20
Figure 7 : Schéma de la régulation de la compaction de la chromatine par les modifications post-traductionnelles d'histones et son implication dans la physiopathologie neuronale..... 22
Figure 8 : Schéma de la régulation de la compaction de la chromatine par les méthylations de l'ADN et son implication dans la physiopathologie neuronale..... 26
Figure 9 : Schéma de la régulation épigénétique par les ARNnc et leur implication dans la plasticité neuronale..... 30
Figure 10 : Schéma simplifié de l'initiation de cassures double-brin dans l'ADN et des mécanismes de réparation par recombinaison homologue ou par la jonction des extrémités non homologues. 34
Figure 11 : Exemples de techniques permettant d'étudier les cassures double-brin. 38
Figure 12 : Rôle épigénétique des cassures double-brin dans la modulation de l'expression des gènes..... 42
Figure 13 : Le rôle des cassures double-brin induites par la stimulation dans la plasticité neuronale..... 48
Figure 14 : Impact des virus sur la réponse aux cassures double-brin de l'ADN. 54
Figure 15 : Taxonomie de la famille des *Bornaviridae*..... 58
Figure 16 : Image par microscopie électronique d'une particule virale de BoDV. 60
Figure 17 : Organisation du génome du BoDV et schéma simplifié des différents transcrits viraux synthétisés au cours du cycle viral..... 62
Figure 18 : Représentation schématique d'une particule du BoDV. 64
Figure 19 : Schéma du cycle de réplication du BoDV. 66
Figure 20 : Carte des interactions connues entre les protéines virales et signaux de transport nucléocytoplasmique. 70
Figure 21 : Structure et organisation des vSPOT..... 72
Figure 22 : Analyse rétrospective d'encéphalites virales potentiellement causées par une infection par le BoDV-1 chez l'Homme, à l'Hôpital Universitaire de Regensburg (Allemagne), depuis 1995..... 74
Figure 23 : Schéma de la voie « naturelle » d'invasion du cerveau par le BoDV chez les chevaux..... 76
Figure 24 : Signes cliniques de la maladie de Borna chez les chevaux à différentes phases de la maladie. 78
Figure 25 : Les principaux modèles d'infections virales. 86

Figure 26 : Schéma des trois principaux mécanismes de mort des neurones médiés indirectement par une infection par le BoDV *in vivo*. 88
Figure 27 : Illustration de l'organisation de l'unité neurovasculaire. 102
Figure 28 : Illustration schématique des changements physiques ou non physiques de la barrière hémato-encéphalique durant l'inflammation systémique. 104
Figure 29 : Polarisation M1/M2 de la microglie et leurs fonctions immuno-régulatrices. 108
Figure 30 : Dynamique de la réponse neuroinflammatoire, de la neuroinflammation aiguë à la neuroinflammation chronique. 112
Figure 31 : L'enzyme IDO et la voie kynurénine dans la neuroinflammation chronique. 118
Figure 32 : Voies de signalisation de l'IL-1β. 128
Figure 33 : Organisation des récepteurs IL-1R neuronaux et des différentes voies de signalisation engagées. 130
Figure 34 : Aperçu des mécanismes d'action majeurs de l'interleukine lL-1β sur la plasticité neuronale, la mémoire et l'apprentissage 144
Figure 35 : Programme général de l'organisation des expériences chez l'animal 202
Figure 36 : Présentation des tests comportementaux utilisés pour évaluer l'anxiété et la mémoire des souris traitées. 204
Figure 37 : Illustration schématique de la localisation de la région d'intérêt, dans l'hippocampe choisie pour le comptage des populations cellulaires sur une section de cerveau. 210
Figure 38 : L'IL-1β et l'IL-6 augmentent les niveaux de cassures double-brin dans des neurones primaires d'hippocampe de souris. 214
Figure 39 : Courbe de l'évolution des poids des souris C57BL6/J au cours de l'infusion systémique d'IL-1 β. 216
Figure 40 : Le traitement chronique par de l'IL-1β ne semble pas induire d'anxiété ou de troubles moteurs chez la souris sauvage 218
Figure 41 : Le traitement chronique par de l'IL-1β conduit à des troubles de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante 220
Figure 42 : La numération des populations gliales ne semble pas modifiée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β 222
Figure 43 : La neurogenèse ne semble pas altérée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β. 224
Figure 44 : Le traitement chronique par de l'IL-1β induit une augmentation du nombre de neurones avec des cassures double-brin, dans l'hippocampe. 226
Figure 45 : La déficience du récepteur IL-1R1 prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β 228
Figure 46 : Test comportemental et analyse des populations des cellules gliales pour les expériences avec les souris iH2A.X KO. 230
Figure 47 : Schéma hypothétique du détournement des cassures double-brins par le BoDV pour moduler sa propre réplication. 240

Liste des abréviations

53BP1 : *p53 binding protein 1*

Aβ : β-amyloïde

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNnc : ARN non-codant

ATM : *Ataxia telangiectasia mutated*

ATP : Adénosine triphosphate

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BDV : *Borna Disease Virus*

BDNF : *Brain derived neurotrophin factor*

BoDV : *Mammalian 1 orthobornavirus* (espèce de référence)

BoDV-1 : *Borna disease virus 1*

BRCA1 : *Breast cancer 1*

CA : Corne d'ammon

CaMKII : *Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II*

CDB : Cassure double brin

CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRE : *c-AMP response element*

CREB : *CRE-binding protein*

DAMP : *Danger associated molecular pattern*

DDR : Réponse aux dommages à l'ADN

DMT : *DNA methylase*

DNMT : *DNA methyltransferase*

DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*

EBL : *Endogenous Borna-like element*

EBLN : *Endogenous Borna-like nucleoprotein*

EPM : *Elevated plus maze*

eNMDAR : NMDAR extrasynaptique

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

G : Glycoprotéine

GABA : *γ-aminobutyric acid*

GD : Gyrus denté

GFAP : *Glial fibrillary acidic protein*

HAT : *Histone acetyltransferase*

HDAC : *Histone deacetylase*

HDMT : *Histone demethylase*

HMGB1 *High-mobility group box 1*

HMT : *Histone methyltransferase*

HR : Recombinaison homologue (*Homologous recombinaison*)

HSV-1 : *Herpes simplex virus-1*

IBA-1 : *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN : Interféron

iH2A.X KO : *Induced* H2A.X *knock-out*

iIL-1R1 KO : *Induced* IL-1R1 *knock out*

IL-1β : Interleukine-1 béta

IL-1R1/2/3 : *IL-1β receptor type 1/2/3*

IL-1ra : *IL-1 receptor antagonist*

IL-1RAcP : *IL-1β receptor accessory protein* (= IL-1R3)

IL-6 : Interlekine-6

iNMDAR : NMDAR intrasynaptique

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

Kb : Kilobase

kDa : kiloDalton

KO : *Knock-out*

L : ARN polymérase ARN dépendante virale

lncRNA : *Long non-coding RNA*

LPS : Lipopolysaccharide

LT/LB : Lymphocytes T/Lymphocytes B

M : Protéine de Matrice

MAP2 : *Microtubule-associated protein 2*

MAPK : *Mitogen-associated protein kinase*

MBD : *Methyl-CpG-binding domain*

MEA : *Micro electrode array*

MeCP2 : *Methyl-CpG-binding protein 2*

miRNA : *MicroRNA*

MPT : Modification post-traductionnelle

N : Nucléoprotéine

NES : Signal d'export nucléaire

NF-κB : *Nuclear factor-kappa B*

NHEJ : Jonction des extrémités non homologues (*Non-homologous end joining*)

NLS : Signal de localisation nucléaire

NMDA : Acide *N*-méthyl-D-aspartique

NMDAR : Récepteurs NMDA

OL : Lignée cellulaire dérivée d'un oligodendriome

P : Phosphoprotéine

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PARP1 : *Poly (ADP-ribose) polymerase 1*

PKC : Protéine kinase C

PRR : *Pattern recognition receptor*

RABV : Virus de la rage

RNP : Ribonucléoparticule

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

SBS : *Sickness behavior syndrome*

siRNA : *Short interfering RNA*

SNAP25 : *Synaptosomal-associated protein*, 25kDa

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

TIR : *Toll-interleukin receptor*

TOP2β : *Topoisomérase IIβ*

TGF-β : *Transforming growth factor β*

TNFα : *Tumor necrosis factor α*

UNV : Unité neurovasculaire

vSPOT : *viral Speckle of transcripts*

WB : *Western blot*

X : Protéine X

ZIKV : Virus Zika

W

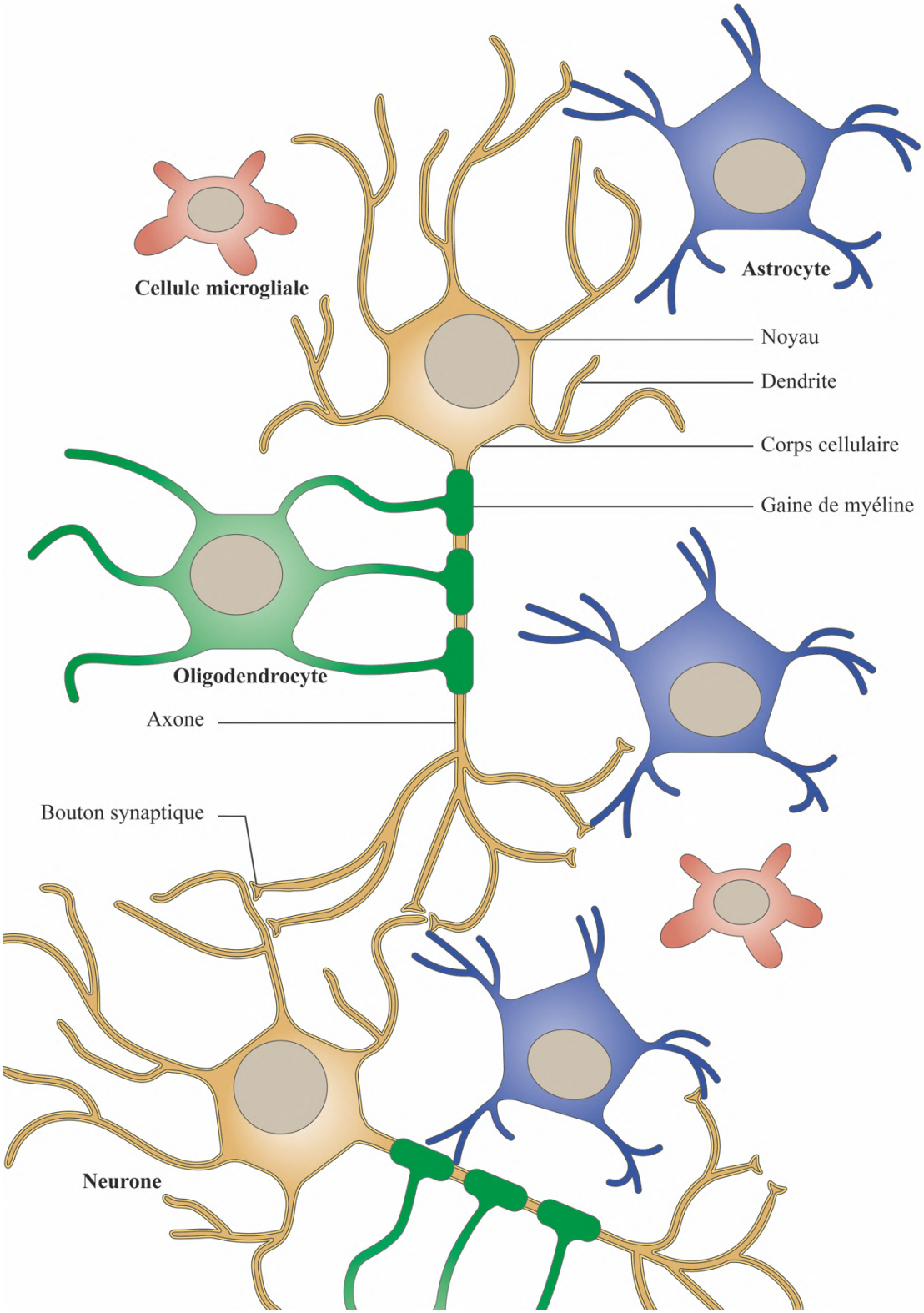


Figure 1 : Représentation schématique des populations résidant dans le système nerveux central.
Le nom de chaque sous-type cellulaire est écrit en gras. Les autres éléments correspondent aux différentes structures des neurones.

Introduction

I. LE CERVEAU, LA MEMOIRE ET LEUR PLASTICITE

1. LE CERVEAU EST LE SIEGE DE LA MEMOIRE

1.1. *Le système nerveux et les neurones*

Même s'il ne représente en moyenne que 2 % du poids du corps, le cerveau consomme 20 % de l'énergie produite par le corps. C'est l'organe le plus complexe, siège de notre mémoire, de nos pensées, de nos actions et de nos émotions. Il est constitué d'environ 100 milliards de cellules nerveuses, organisées en réseaux, qui communiquent entre-elles par d'innombrables contacts. Le cerveau fait partie du système nerveux central (SNC) qui, avec le système nerveux périphérique (SNP), assurent la perception de notre environnement, son intégration et l'élaboration d'une réponse spécifique et adaptée, permettant le bon fonctionnement de l'organisme. Le SNC est composé de plusieurs types cellulaires, aux fonctions différentes, interagissant les uns avec les autres (Figure 1). Les cellules résidentes du SNC sont la microglie qui correspond aux macrophages du cerveau, les « sentinelles », formant la principale défense immunitaire grâce à ses capacités phagocytaires. Puis, les astrocytes, des cellules capables de se lier aux neurones, ayant de multiples fonctions dont de support, d'apport de nutriments, de recyclage des déchets, etc… Les oligodendrocytes ont un rôle de soutien, ils permettent de créer et maintenir l'architecture du réseau neuronal en jouant le rôle de piliers entre les neurones. Les prolongements des oligodendrocytes entourent les axones des neurones pour former la gaine de myéline. La gaine de myéline favorise la transmission du signal électrique le long des axones. Ces trois types cellulaires font partie de la famille des cellules gliales qui assurent l'homéostasie neuronale. Enfin, les neurones, qui sont des cellules post-mitotiques hautement spécialisées assurant la transmission d'activité électrique.

Les neurones sont composés d'un corps cellulaire et de deux types de prolongements : les dendrites qui réceptionnent les messages nerveux électriques, ou potentiels d'action. Ce signal

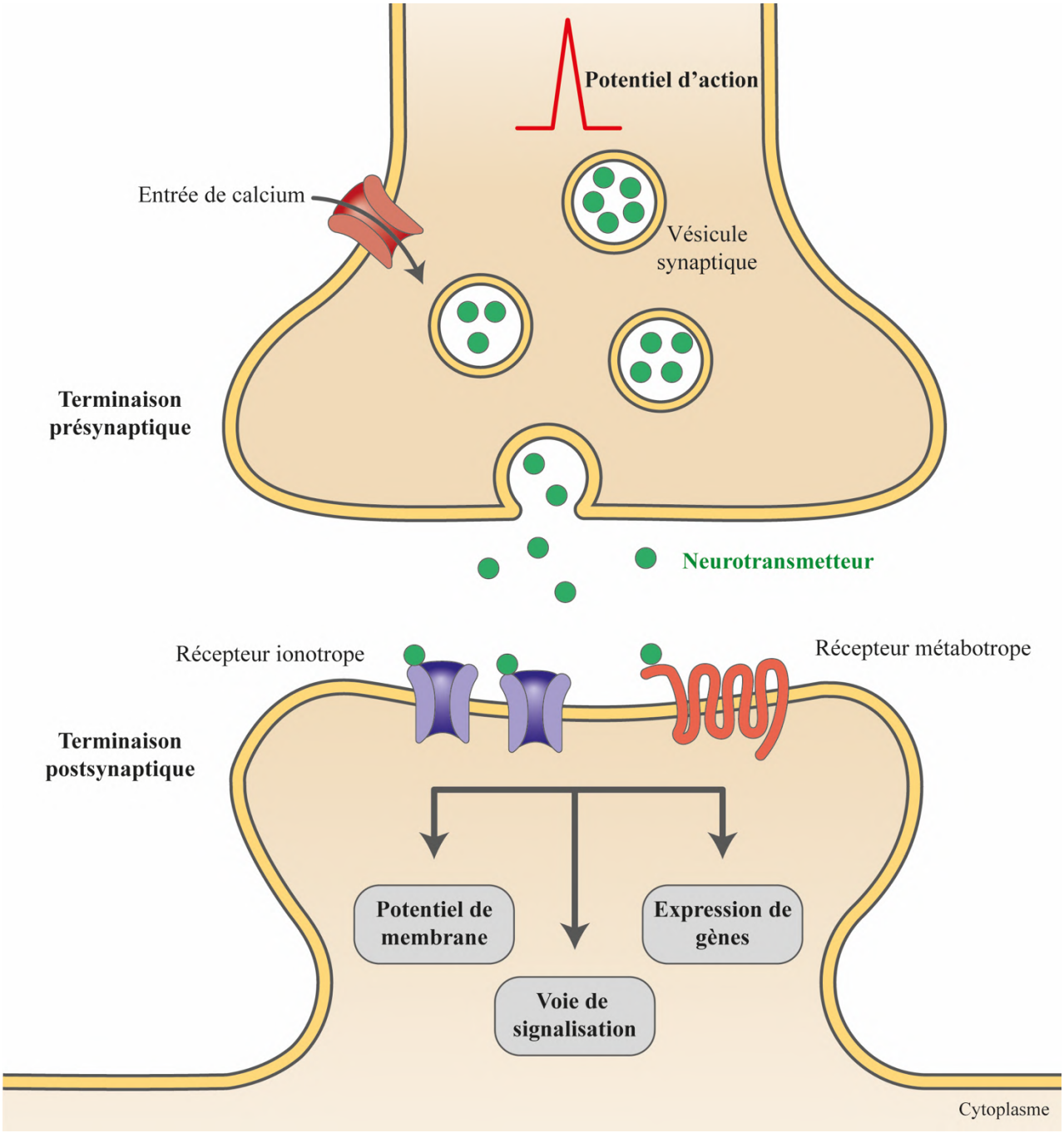


Figure 2 : Schéma de la transmission de l'influx nerveux au niveau d'une synapse chimique.
L'arrivée du potentiel d'action à la terminaison présynaptique induit une entrée de calcium provoquant la fusion des vésicules synaptiques à la membrane. Les neurotransmetteurs contenus dans les vésicules sont relargués dans l'espace synaptique et vont se fixer sur leurs récepteurs à la surface de la membrane postsynaptique. Cette fixation induit la transduction du message présynaptique en différents évènements postsynaptiques. D'après Pereda, 2014.

électrique est alors converti en signal chimique jusqu'au corps cellulaire, pour générer un nouveau potentiel d'action qui est transféré le long des axones. A la terminaison de l'axone, se trouvent les boutons synaptiques, zones de communication entre plusieurs neurones (Figure 1). Ces structures sont aussi présentes le long des prolongements neuronaux et sont alors appelés boutons en passant. Les boutons synaptiques (ou en passant) correspondent aux terminaisons présynaptiques qui reçoivent le potentiel d'action pour les convertir en message chimique en libérant des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique. En vis-à-vis de ces boutons, se trouvent les terminaisons postsynaptiques qui présentent à leur surface plusieurs types de récepteurs capables de lier les neurotransmetteurs relargués. Les récepteurs stimulés peuvent être des récepteurs ionotropes (canal transmembranaire ionique) ou métabotropes (récepteurs à sept domaines transmembranaires). Les messages chimiques vont se reconvertir en activité électrique mais vont également activer des voies de signalisation dans les cellules (Figure 2) (Pereda, 2014). L'ensemble de l'espace de conversion des informations nerveuses est la synapse.

Le cerveau est subdivisé en plusieurs régions interconnectées. Une de ces régions est le système limbique, siège des émotions, de l'apprentissage et de la mise en place de la mémoire.

1.2. *La mémoire*

La mémoire est une fonction complexe, dépendante de l'intégrité de plusieurs structures cérébrales. En psychologie, il est communément admis de distinguer deux grands types de mémoire : la mémoire à court terme (mémoire de travail) et la mémoire à long terme. La mémoire à long terme, contrairement à la mémoire à court terme, correspond à la faculté de retenir une information plus longtemps et suggère donc une forme « d'encodage » dans le cerveau. Une classification dichotomique a été proposée, permettant de subdiviser les différents sous-types de mémoire à long terme en mémoire déclarative et explicite (verbale) et non-déclarative (non verbale, comme « faire du vélo ») (Zola-Morgan *et al.,* 1986). Ces différents types de mémoire sont interactifs et impliquent des structures cérébrales différentes et se distinguent par leur mode d'encodage (Bird & Burgess, 2008).

Chez l'Homme, le système limbique est impliqué dans la mise en place de la mémoire déclarative. Plus particulièrement dans le système limbique, des lésions de l'hippocampe ont montré l'importance de cette région dans la mise en place de ce type de mémoire (Zola-Morgan *et al.,* 1986). La mémoire déclarative ou explicite permet d'encoder des connaissances générales (mémoire sémantique : « Paris est la capitale de la France ») mais également des

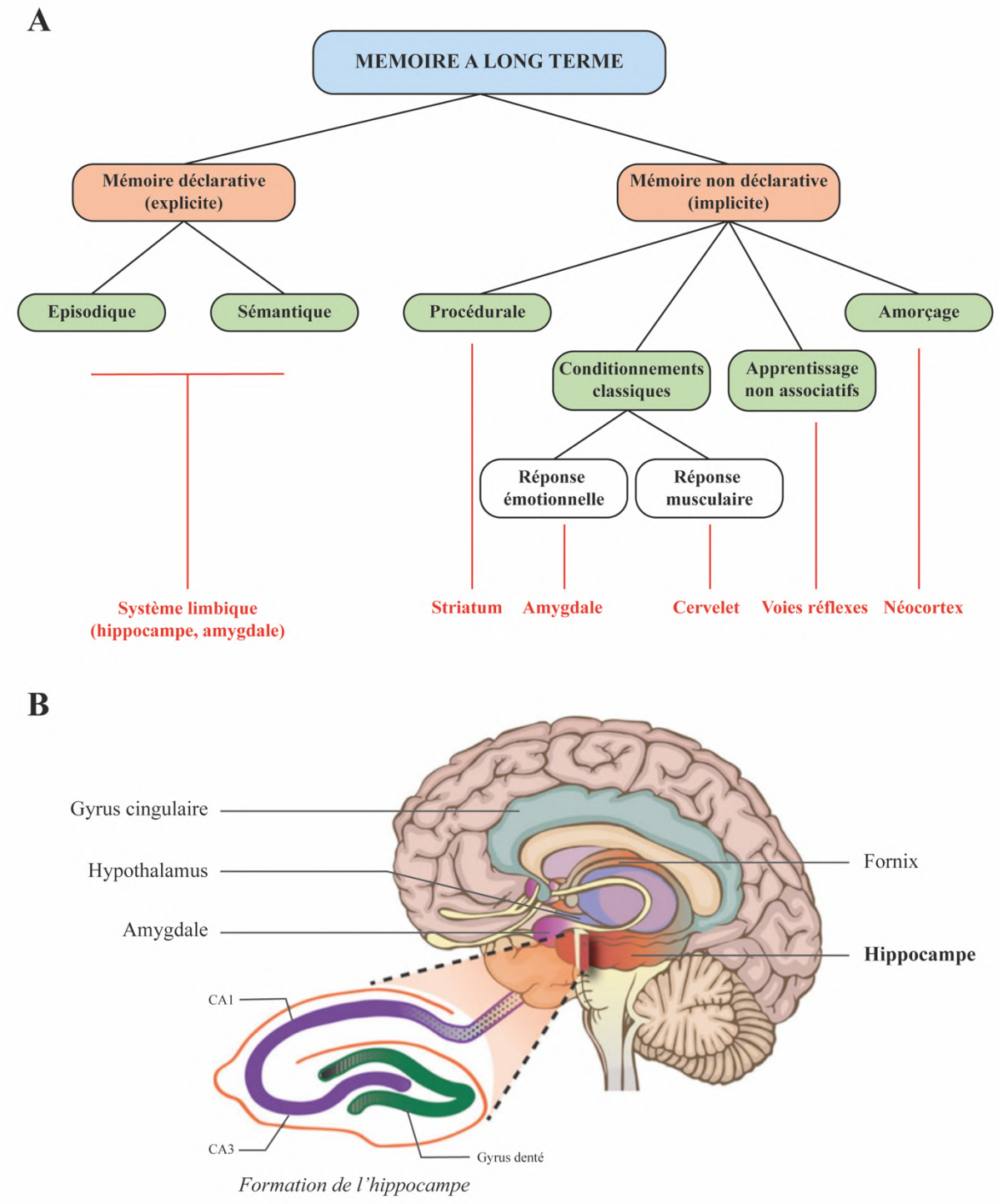


Figure 3 : Le système limbique et l'hippocampe : rôle dans la mémoire à long terme et organisation.

(A) Schéma de l'organisation dichotomique de la mémoire à long terme selon Squire (1996). Le système limbique joue un rôle central dans la mémoire déclarative. **(B)** Schéma du système limbique et de la formation de l'hippocampe. L'hippocampe est subdivisé en deux sous-structures : le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA), elle-même subdivisée en plusieurs aires dont CA1 et CA3. (B) Adapté de www.creative-diagnostics.com/blog/index.php/what-is-hippocampus/.

souvenirs autobiographiques intégrant une notion de temps et d'espace (mémoire épisodique : « j'ai écrit ma thèse dans mon salon au premier semestre de 2021 »). C'est dans ce dernier sous-type de mémoire que l'hippocampe interviendrait, pour la mémorisation de faits, dans un contexte spatio-temporel (Figure 3A) (Eichenbaum, 2017). L'hippocampe est une région du système limbique qui est en charge de l'intégration contextuelle de processus cognitifs et de la régulation des émotions. L'hippocampe est composé de deux entités : le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA), elle-même subdivisée en quatre sous-unités (CA1, CA2, CA3, et récemment identifiée CA4) (Figure 3B). Ces régions sont interconnectées et l'hippocampe est aussi capable d'intégrer des informations en provenance d'autres régions du cerveau. De façon simplifiée, le cortex enthorhinal assimile les informations sensitives des aires associatives et transmet la synthèse de ces informations vers le GD dans l'hippocampe. Puis, les informations transitent par le CA3 et ensuite par le CA1. Enfin, les informations sont envoyées du CA1 vers le subiculum. Ce circuit permet finalement l'encodage de la mémoire épisodique (Matsumoto *et al.*, 2019; Tatu & Vuillier, 2014).

Ainsi, l'hippocampe joue un rôle central dans la synthèse et l'encodage des informations reçues de l'environnement, pour les processus d'apprentissage et de mémoire. Ces processus nécessitent la mise en place de modifications durables de l'hippocampe qui mettent en jeu les mécanismes de plasticité neuronale qui seront décrits dans le paragraphe suivant.

Même s'il est difficile d'évaluer la mémoire déclarative chez l'animal, qui par définition est consciente et verbalisable, des stratégies ont été développées pour pouvoir l'étudier. En effet, de nombreux tests comportementaux ont été mis en place afin d'étudier la capacité de l'animal à réaliser des tâches d'apprentissage et de mémorisation impliquant l'hippocampe. Par la suite, je vous présenterai brièvement des exemples de tests qui ont pour objectif d'évaluer la mémoire hippocampo- ou non hippocampo-dépendante. Certains ont été utilisés durant mon projet de thèse (**en gras)** et seront présentés plus en détails dans le « Matériels et Méthodes » de la section correspondante de mes résultats.

La mise en place de la mémoire au sein de l'hippocampe suppose que le cerveau puisse s'adapter aux stimuli qu'il intègre. Le processus d'apprentissage sous-entend des notions « d'écriture » ou de « codage » de l'information pour qu'elle puisse être réutilisée plus tard. Les neurones sont donc capables d'adapter leur fonctionnement aux stimuli afin d'apporter la réponse la plus adaptée. Cette capacité d'adaptation, de remodelage, représente la plasticité neuronale.

2. LE CERVEAU : UN ORGANE QUI S'ADAPTE

2.1. *Le concept de la plasticité neuronale*

Le fonctionnement du système nerveux est élaboré de manière à ce qu'un individu puisse s'adapter et interagir avec un environnement nouveau. Le cerveau possède la faculté remarquable d'être « modifiable » ou « plastique », d'où la notion de la plasticité du cerveau. Tout au long de la vie, le cerveau va être confronté à différents stimuli, l'apprentissage modifie alors la force des connexions entre les neurones et modifie le réseau neuronal en favorisant l'apparition, la destruction ou la réorganisation des synapses, mais aussi des neurones eux-mêmes. A l'échelle de la cellule et du réseau, on parle alors de plasticité neuronale. La plasticité neuronale a été découverte dans une région du système limbique, l'hippocampe. Cette région est la plus sujette à être plastique car elle est le siège du stockage initial de la mémoire spatiale et déclarative.

Nous ne pourrons pas explorer en détail tous les mécanismes mis en jeu dans cette plasticité neuronale car cela représente une thèse en elle-même. Cependant, afin de faciliter la compréhension du rôle de certains mécanismes cellulaires dans la plasticité neuronale, mécanismes qui ont fait l'objet de ma thèse, je vais présenter quelques éléments clés.

Les messagers chimiques relargués dans l'espace synaptique sont appelés des neurotransmetteurs. Certains de ces neurotransmetteurs, comme le glutamate ou l'acétylcholine, vont se fixer sur des récepteurs spécifiques qui vont exciter les neurones. Cette fixation induit une dépolarisation des neurones postsynaptiques et permet de propager le signal électrique. D'autres, comme le GABA (*γ-aminobutyric acid*) ou la glycine, peuvent se fixer sur des récepteurs qui vont inhiber les neurones. Ainsi un neurone peut recevoir des signaux excitateurs et inhibiteurs dont la résultante intégrée, déclenche l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation spécifiques. Ces voies de signalisation ont des effets immédiats en agissant, entre autres, sur des modifications post-traductionnelles de protéines cellulaires déjà présents et permettent, par exemple, l'expression à la surface ou, au contraire, l'internalisation de récepteurs aux neurotransmetteurs. Plus tardivement, ces voies de signalisation agissent sur la relocalisation de facteurs de transcription dans le noyau, pour permettre de moduler l'expression de gènes neurotrophiques, comme le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), important pour la survie, le développement et la plasticité neuronale (Citri & Malenka, 2008). Ces mécanismes tardifs conduisent des changements d'expression protéiques qui soustendent

une restructuration des prolongements neuronaux et une modification du nombre de synapse à la surface des cellules. De plus, les neurones peuvent intégrer des signaux, extérieurs à la synapse, qui proviennent de stimuli de l'environnement cellulaire (présence de drogues, facteurs de stress, cytokines, etc…).

Finalement, les neurones sont capables d'assimiler une grande quantité de signaux permettant d'adapter leur réponse. D'un côté, l'expression et la synthèse *de novo* de protéines permettent la génération de nouveaux prolongements et de nouvelles synapses, renforçant des connexions existantes et très sollicitées. Au contraire, l'inhibition de tous ces phénomènes va avoir tendance à faire régresser et « fragiliser » des connexions inutilisées. Le concept de plasticité neuronale peut ainsi se résumer par le principe « utilise-le ou perds-le !» qui fait référence aux synapses, aux prolongements ou même aux neurones.

2.2. *Le rôle central des NMDAR dans la plasticité neuronale*

Les récepteurs au NMDA à la synapse (NMDAR : récepteurs à l'acide *N*-méthyl-D-aspartique) jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus de la plasticité neuronale (Lynch, 2004). Ces récepteurs constituent un sous-groupe de récepteurs qui lient un neurotransmetteur excitateur, le glutamate. Pour imiter une stimulation, il est possible de traiter des neurones avec du NMDA, un dérivé d'acide aminé qui se comporte comme un agoniste spécifique des NMDAR. Il existe des NMDAR au niveau de la synapse (intrasynaptique : iNMDAR) mais également des NMDAR à l'extérieur de la synapse (extrasynaptique : eNMDAR). Les récepteurs intrasynaptiques sont alors les premiers activés lors du relargage de glutamate à la synapse. La stimulation iNMDAR conduit à l'entrée de calcium (Ca^{2+}) qui active plusieurs cascades de signalisation dont la voie ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), CaMKII (*Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II)* et la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Sun *et al.*, 2018; Hardingham & Bading, 2010). Cette stimulation active également des processus de réorganisation de la synapse dont l'exocytose de nouveaux iNMDAR. La stimulation des voies de signalisation induit l'activation de la transcription de gènes dépendants de l'activité par l'intermédiaire du complexe de transcription CREB/CBP (*c-AMP response element-binding protein/CREB-binding protein*). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription dits précoces qui vont permettre notamment la transcription de neurotrophines comme le BDNF. La stimulation de ces récepteurs représente une activation « normale » ou physiologique et a donc un rôle positif sur les neurones en favorisant leur

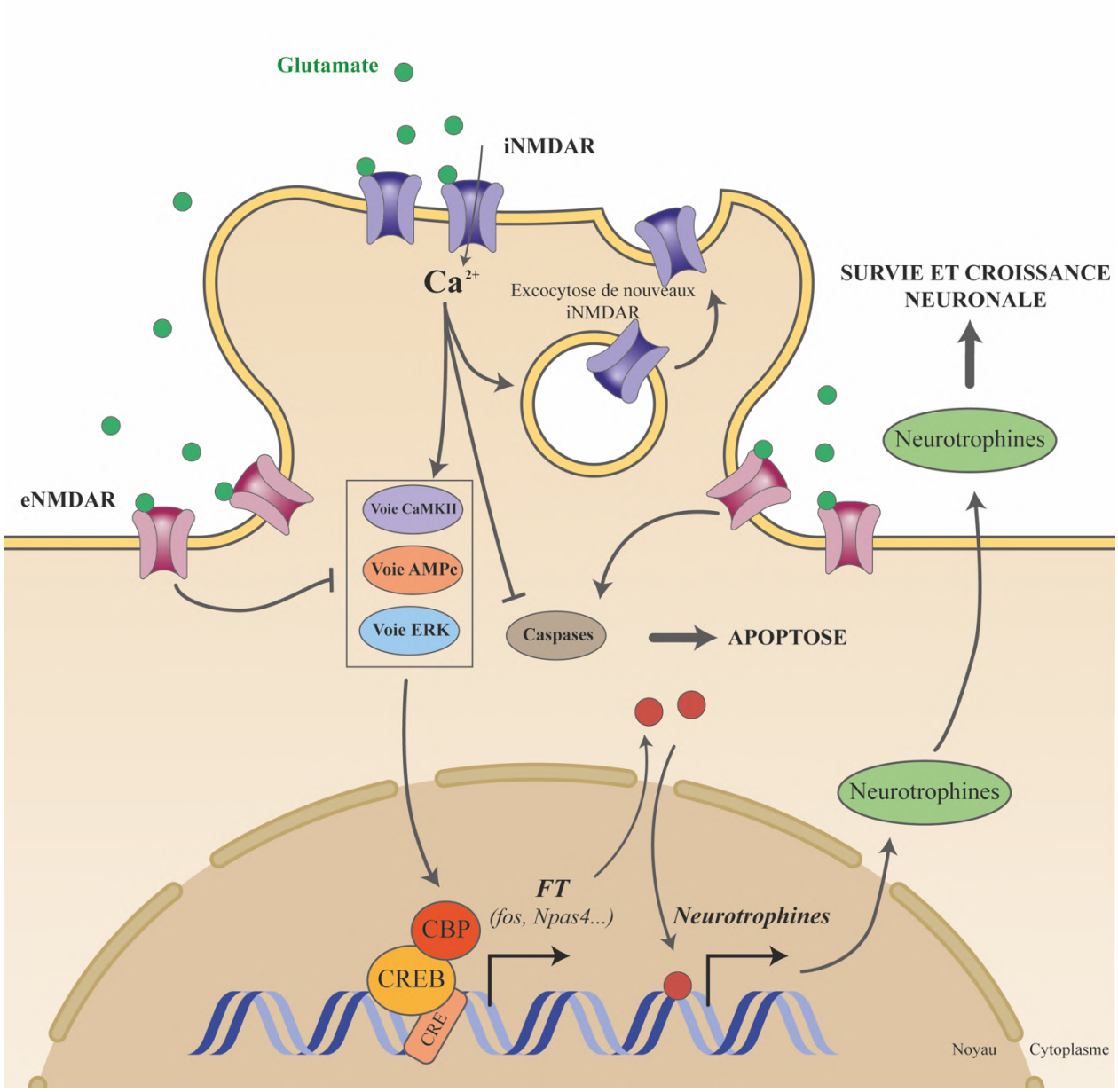


Figure 4 : Schéma des voies de signalisation activées après stimulation des différents récepteurs au NMDA neuronaux, en fonction de leur localisation.
La stimulation des iNMDAR induit, entre autres, l'expression à la surface de nouveaux iNMDAR afin de renforcer la synapse, l'activation de voies de signalisation, l'inhibition des caspases et plus généralement des facteurs pro-apoptotiques. La stimulation des eNMDAR résulte d'un débordement de glutamate en dehors de la synapse et conduit à de l'excitotoxicité. Les eNMDAR activent la voie des caspases et des facteurs pro-apoptotiques et inhibent les voies activées par iNMDAR. Les voies de signalisation activées, permettent la fixation du facteur de transcription CREB et de son cofacteur CBP sur la séquence CRE de l'ADN, pour permettre la transcription de gènes codant des facteurs de transcription précoces (FT) dépendants de l'activité. Ces facteurs de transcription permettent à leur tour d'induire la transcription de neurotrophines importantes pour la plasticité neuronale, comme le BDNF. Le BDNF a de multiples fonctions dans la survie, la croissance et le renforcement des neurones. Adapté de Hardingham, 2010 ; Sun, 2018.

renforcement et leur survie. Au contraire, les récepteurs extrasynaptiques sont stimulés lorsqu'il y a un excès de glutamate et que celui-ci sort de la synapse. Cette activation fait donc réponse à une stimulation excessive et non physiologique des neurones. Cette stimulation dite excitotoxique va essentiellement inhiber les voies de signalisation activées par les iNMDAR et va déclencher des voies de signalisation favorisant plutôt l'apoptose et la neurodégénérescence dans certaines régions du cerveau (Figure 4) (Sun *et al.*, 2018; Hardingham & Bading, 2010). L'activation des NMDAR induit l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation qui permettent de réguler la synthèse de protéines, le changement de structure des neurones, la transcription de gènes impliquant des mécanismes épigénétiques ou encore l'induction de l'apoptose.

2.3. *La plasticité neuronale à l'échelle du réseau neuronal*

Une caractéristique fondamentale du cerveau est sa capacité à intégrer des informations coordonnées durant des activités sensorielles, motrices ou cognitives. Cette intégration dépend, à l'échelle des réseaux, de la sommation des influx sur un même réseau de neurones. Ainsi, un réseau très sollicité va adapter sa réponse en renforçant les connexions entre les neurones pour être plus facilement activé lorsqu'il sera restimulé (Bassi *et al.*, 2019).

Tout comme le cerveau qui, à l'échelle de l'organe, se nourrit de l'expérience des stimuli environnementaux pour apprendre et mémoriser, les neurones, à l'échelle cellulaire, sont capables d'emmagasiner de l'information, « d'apprendre » pour mieux répondre aux prochains stimuli. L'analogie est toute trouvée avec la notion d'épigénétique qui, cette fois au niveau moléculaire, permet d'adapter l'expression de gènes en réponse à un signal transitoire. C'est pourquoi depuis une vingtaine d'années de recherche, les mécanismes épigénétiques sont apparus comme jouant un rôle fondamental dans la différenciation et la plasticité neuronale, et plus largement dans la physiologie du SNC. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires épigénétiques impliqués dans cette neuroplasticité, que ce soit dans un contexte physiologique ou bien pathologique.

Dans le chapitre suivant, à travers la présentation succincte des mécanismes épigénétiques connus, je vous exposerai quelques exemples de l'importance de ces mécanismes dans le développement et la physiologie neuronale, mais également dans la régulation des fonctions cognitives. Aussi, je présenterai quelques exemples déjà décrits de perturbation de ces mécanismes épigénétiques qui sont la cause de maladies neurologiques.

II. EPIGENETIQUE ET PLASTICITE NEURONALE

Les troubles neurologiques peuvent toucher toute la population. Plusieurs études épidémiologiques convergent dans le sens où la prévalence de ces troubles neurologiques est en constante progression à travers le monde. Du côté des maladies neuropsychiatriques, il a été estimé en 2017 que presque 11 % de la population mondiale vivait avec ce type de maladie (dépression, troubles bipolaires, etc…) (Ritchie, 2018). La même année, une autre étude, en Europe, s'est intéressée aux troubles neurologiques de type démence (maladie d'Alzheimer, etc…), à la maladie de Parkinson, à la sclérose en plaques, au cancer du cerveau, à l'épilepsie, aux maladies des neurones moteurs, aux maladies neuroinfectieuses et aux accidents vasculaires cérébraux. Cette étude révèle que plus de 35 % de la population européenne (soit 200 millions d'individus) est touchée par au moins une de ces maladies (Deuschl *et al.*, 2020).

En outre, avec l'allongement de l'espérance de vie et une population vieillissante, les maladies neurodégénératives sont amenées à toucher de plus en plus de personnes et représentent déjà, à l'heure actuelle, un coût important dans la prise en charge médicale. Comprendre les causes des maladies neurologiques mais aussi des autres troubles neuropsychiatriques comme la dépression, l'anxiété, la schizophrénie, l'épilepsie ou d'autres devient donc un enjeu majeur pour la recherche future.

Beaucoup de pathologies complexes, incluant un certain nombre de maladies neurologiques, ont pour origine une composante génétique. Cependant, il est maintenant admis que des facteurs environnementaux peuvent modifier de façon transitoire ou chronique le code épigénétique, conduisant au développement de pathologies plus ou moins sévères. L'étude et le suivi approfondi de jumeaux monozygotes partageant le même patrimoine génétique, révèle que leurs profils épigénétiques se différencient de plus en plus avec l'âge. Ces différences expliquent en partie les discordances phénotypiques et les différences de susceptibilité au développement de maladies, observées chez les jumeaux monozygotes (Fraga *et al.*, 2005). L'intérêt grandit pour l'étude des perturbations de l'épigénétique comme cause du développement de certaines maladies. L'impact de l'environnement sur l'épigénétique est un domaine d'étude globalement focalisé sur le développement de cancers ou de maladies auto-immunes, dans des modèles de cellules mitotiques. En comparaison, le rôle de l'épigénétique dans les maladies neurologiques et les mécanismes sous-jacents sont un domaine d'étude émergeant ces 20 dernières années.

Pour commencer, j'introduirai le concept et les mécanismes de l'épigénétique. Ensuite, je vous présenterai le rôle de l'épigénétique dans la plasticité neuronale qui est au cœur des capacités d'adaptation du cerveau. Je mettrai en évidence l'importance d'étudier les perturbations de ces mécanismes épigénétiques dans les maladies neurologiques afin de mieux comprendre les processus physiopathologiques mis en jeu. Enfin, je vous ferai découvrir le rôle d'un nouveau mécanisme épigénétique, les cassures double-brin de l'ADN neuronal, encore peu étudié, dans la physiologie neuronale et, pourquoi il est pertinent maintenant d'étudier les perturbations de ce mécanisme dans la pathogenèse des maladies neurologiques.

1. GENERALITES

1.1. *Le concept d'épigénétique*

« Si les caractères de l'individu sont déterminés par les gènes, pourquoi toutes les cellules d'un organisme ne sont-elles pas identiques ?» (Morgan, 1917)

Cette interrogation de Thomas Morgan, qui se rapporte aux organismes pluricellulaires, impose le constat de différences possibles dans l'expression d'un même génome car les cellules d'un même organisme sont génétiquement identiques. Ne sommes-nous pas préformés, comme le conçoit la théorie du préformationnisme, qui postule que l'être vivant préexiste dans le germe ? Comment, à partir d'une cellule œuf, se développe un organisme entier composé de différents types cellulaires aux profils d'expression génétique d'apparence différents et aux fonctions différentes ? Comment expliquer que des jumeaux monozygotes ne soient pas parfaitement identiques ?

La paternité de l'épigénétique, dans son sens moderne, est attribuée au biologiste et embryologiste Conrad Hal Waddington. Selon lui l'épigénétique dérive de la combinaison de deux termes, « génétique » et « épigenèse » ; l'épigenèse désignant le processus par lequel une forme simple (graine ou embryon) se développe en sa forme finale (Waddington, 2012). Historiquement, le mot « épigénétique » a été utilisé pour décrire des évènements qui ne pouvaient pas être expliqués par les principes de génétique. Ainsi l'épigénétique se définit au départ comme un moyen pour une cellule d'acquérir un profil d'expression de gènes spécifique, lui permettant de se différencier pour remplir une fonction spécialisée (Goldberg *et al.*, 2007).

Une grande partie des recherches en épigénétique se concentre sur la transcription, qui constitue le premier niveau de régulation de l'expression des gènes. En effet, même si l'expression des gènes peut être régulée de plusieurs manières (transcription, épissage, export nucléaire des ARN, traduction…), la transcription semble être le principal niveau de contrôle. L'état « épigénétique » d'une cellule semble dépendre principalement de deux variables : les régulateurs transcriptionnels présents (les facteurs de transcription…) et l'état de compaction de l'ADN, qui va déterminer la capacité des régulateurs transcriptionnels à moduler l'expression des gènes. En résumé, la question posée en épigénétique consiste à comprendre comment, à partir d'un même génome, peuvent se mettre en place des états transcriptionnels distincts (exprimé *versus* non exprimé).

Aujourd'hui, l'épigénétique est un domaine actif de recherche à la croisée entre notions de génotype et phénotype. Ce domaine pourrait donc se définir comme l'étude de l'ensemble des mécanismes modifiant de manière réversible, potentiellement héréditaire, l'expression des gènes sans altération de la séquence d'ADN, en réponse à l'environnement et aux stimuli extérieurs (Gibney & Nolan, 2010).

1.2. *Structure de la chromatine*

1.2.1. Le nucléosome

Le génome humain est composé de 3,2 milliards de paires de nucléotides qui permettent de coder environ 20 000 gènes. Cela représente donc à peu près 2 mètres d'ADN que chaque cellule doit compacter au sein de son noyau. Le challenge pour la cellule est donc double, compacter pour réduire au maximum le volume que l'ADN prend, mais aussi ne pas trop compacter pour permettre la fixation des facteurs sur les gènes. L'ADN s'organise alors avec des protéines de « structure » pour former la chromatine.

La chromatine est une structure organisée en sous-unités moléculaires répétées, associant l'ADN à un groupement protéique, appelé nucléosomes (Olins & Olins, 1974; Oudet, 1975). Le groupement protéique s'intercale de façon régulière sur l'ADN pour servir de support à l'enroulement de 147 paires de bases par nucléosome. La structure prend alors la forme d'un composé d'un octamère de quatre protéines appelées histones de « cœur » (H2A, H2B, H3 et H4) (Arents & Moudrianakis, 1993).

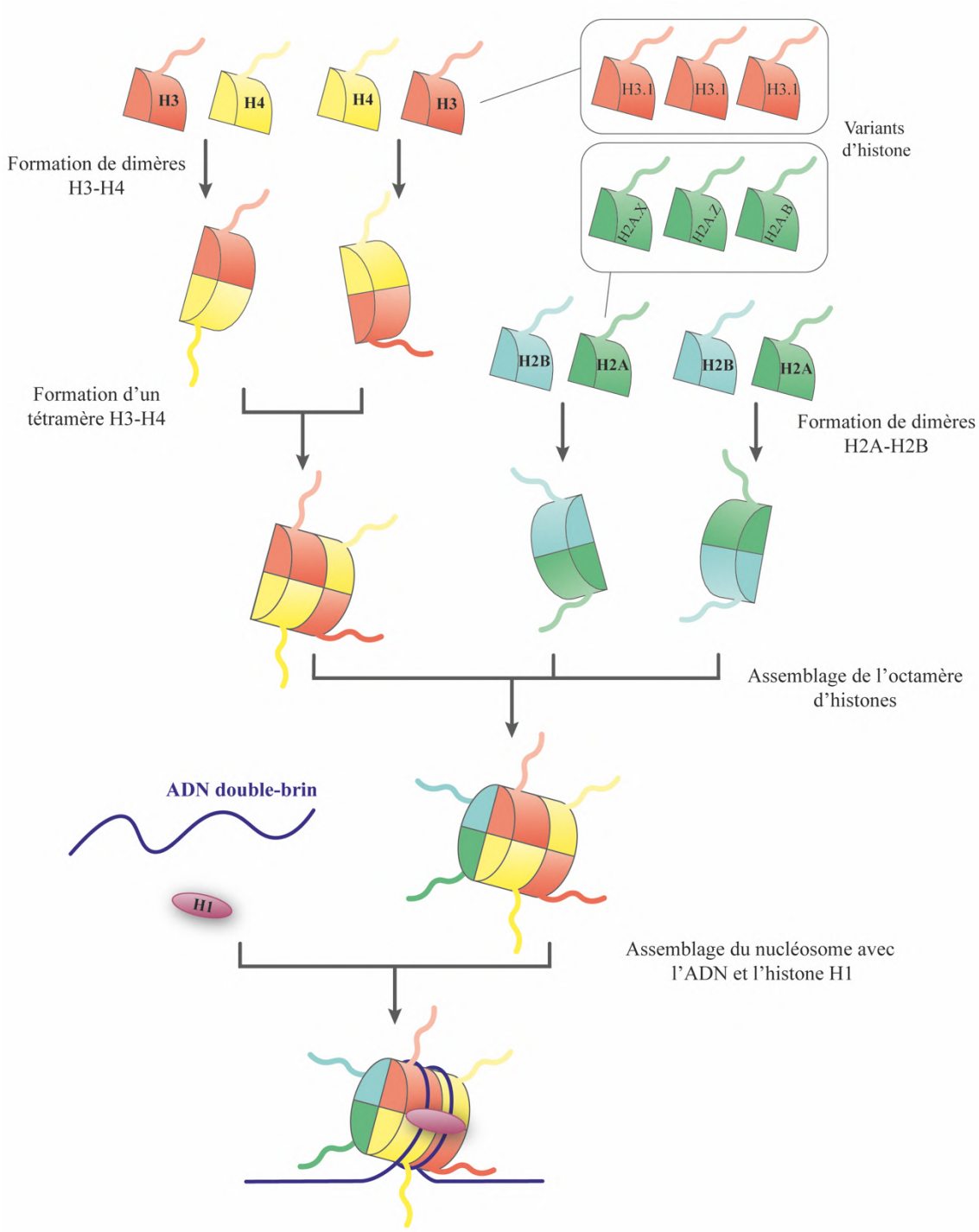


Figure 5 : Schéma de l'assemblage des nucléosomes.
Les histones H2A et H2B forment deux dimères. Les histones H3 et H4 forment également deux dimères qui vont s'assembler pour donner un tétramère H3-H4. Les deux dimères H2A-H2B vont s'associer au tétramère H3-H4 pour former l'octamère d'histones. Cet octamère sert de support pour l'enroulement de l'ADN et l'histone H1 vient consolider l'enroulement. L'unité ainsi formée s'appelle le nucléosome. Les extrémités amino-terminales, qui peuvent recevoir des modifications post-traductionnelles, émergent de chaque histone.

Ces histones conventionnelles peuvent être ponctuellement remplacées par des variants, surtout les protéines H2A et H3, qui ont des rôles de signalisation différents (Kamakaka & Biggins, 2005). Chaque octamère est lui-même composé de deux dimères d'histones H3-H4 assemblés en tétramère au centre qui vont s'associer à deux dimères d'histones H2A-H2B autour du tétramère (Figure 5). De plus, les extrémités amino-terminales des histones projettent en dehors du nucléosome. Ces régions sont les cibles des enzymes qui modifient les histones et des protéines qui reconnaissent ces modifications.

1.2.2. Euchromatine et hétérochromatine

Cet enchainement de nucléosomes en collier de perles est la forme la plus relâchée de la chromatine, il constitue une fibre de 10 nm appelée l'euchromatine. Cette structure est stabilisée par une cinquième histone, l'histone H1, qui vient former un pont avec l'ADN sur les histones (Figure 5-6). Suite à cette stabilisation, cette fibre peut encore s'enrouler sur elle-même pour former une fibre de 30 nm de diamètre appelée l'hétérochromatine (Figure 6) (Babu & Verma, 1987; Maeshima *et al.*, 2014). Ces différentes formes de la chromatine présentent donc différents niveaux de compaction de l'ADN et offrent donc différents niveaux d'accès des gènes aux facteurs de transcription. Lorsque l'euchromatine est moins condensée, elle est considérée comme chromatine ouverte, donnant accès aux gènes pour leur transcription ; tandis que l'hétérochromatine est plus condensée, dite chromatine fermée et elle ne permet pas aux gènes d'être transcrits. Le degré de compaction de la chromatine joue donc un rôle fondamental pour la régulation de la transcription.

Encore actuellement, tous les mécanismes épigénétiques ne sont pas bien établis. Cependant, les recherches se focalisent sur trois d'entre eux qui ont un impact majoritaire : la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et l'interférence des ARN non codants (Levenson & Sweatt, 2005). Après, avoir développer les concepts de plasticité neuronale, je vous présenterai les mécanismes épigénétiques qui régulent la compaction de la chromatine et l'expression des gènes, puis, en quoi ces mêmes mécanismes jouent un rôle important dans la physiologie neuronale.

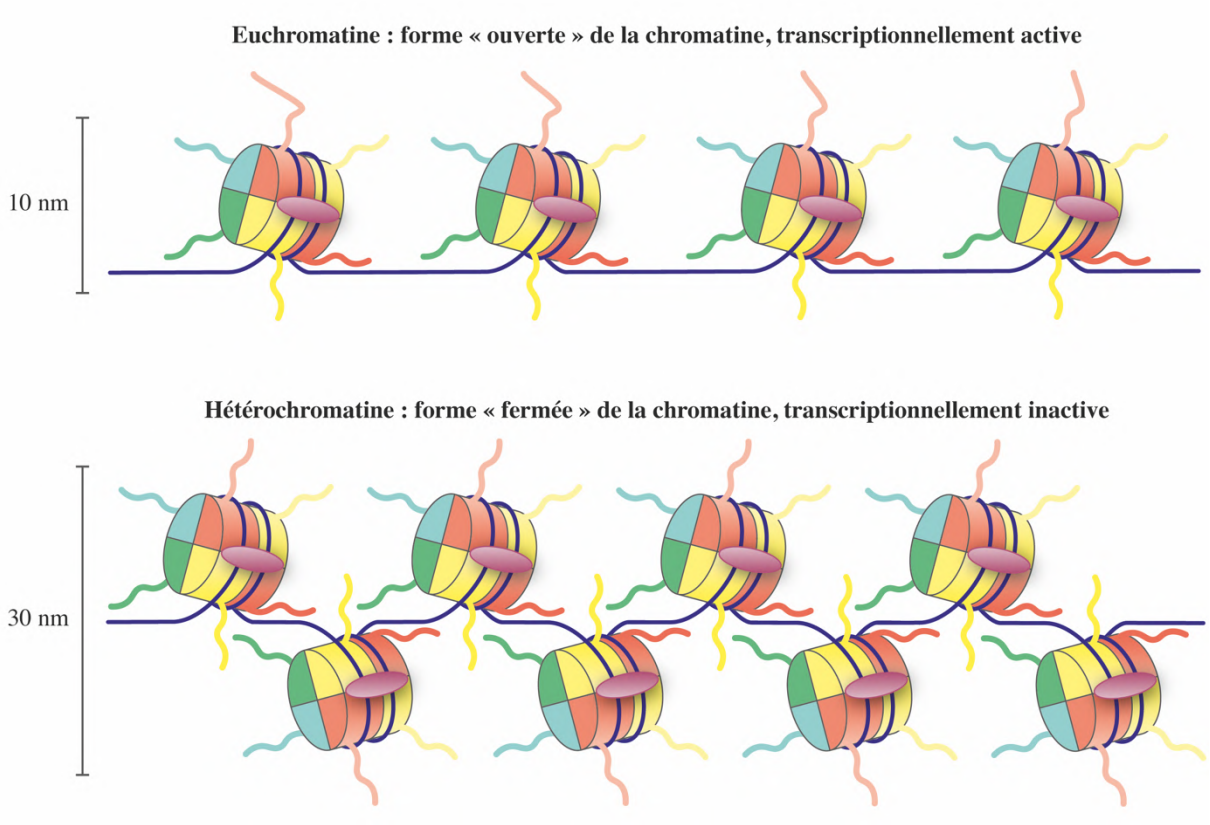


Figure 6 : Modèle de compaction de la chromatine.
Les deux premiers niveaux de compaction de la chromatine, l'euchromatine et l'hétérochromatine, définissent le niveau d'accessibilité de l'ADN pour les facteurs de transcription et donc le statut de transcriptabilité d'un gène.

2. LES ACTEURS EPIGENETIQUES DANS LA PLASTICITE NEURONALE

2.1. *Les modifications post-traductionnelles des histones*

2.1.1. Les mécanismes du « code » des histones

La cible principale des modifications d'histones est la queue amino-terminale qui émerge de chaque histone à l'extérieur du nucléosome. Ces modifications post-traductionnelles (MPT) peuvent être des phosphorylations, des acétylations, des méthylations et éventuellement des sumoylations et des ubiquitinylations, qui ne seront pas traitées dans la suite de l'introduction (Allfrey *et al.*, 1964; Bannister & Kouzarides, 2011). Les différentes MPT des histones ne sont pas présentes au hasard sur les protéines. La mise en évidence de redondances dans les lieux de ces modifications suggère l'existence d'un « code » ou d'un « langage » des histones (Strahl & Allis, 2000). En effet des modifications comme la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, ou l'acétylation de la lysine 5 de l'histone H4 sont des modifications fréquemment retrouvées dans les régions régulatrices de gènes.

De fait, il existe des protéines capables d'écrire, de lire et d'effacer ces modifications d'histones. Ces différentes actions ont permis la classification des différentes familles de protéines intervenant dans le langage des histones (Tollervey & Lunyak, 2012) :

- Les *writers* telles que les *histones methyltransferase* (HMT), les *histones acetyltransferase* (HAT) et les kinases, qui écrivent les MPT.

- Les *readers* possèdent des domaines spécifiques qui reconnaissent les MPT et qui permettent le recrutement d'autres facteurs comme le complexe de réplication ou des facteurs de transcription.

- Les *erasers* telles que les *histones demethylase* (HDMT), les *histones deacetylase* (HDAC) et les phosphatases qui retirent certaines MPT.

Les MPT jouent un rôle majeur dans la modulation de l'expression génique. En effet, certaines modifications sont impliquées dans l'ouverture ou la compaction de la chromatine entraînant ainsi respectivement une augmentation ou une inhibition de l'expression d'un gène. La présence ou non d'une MPT va impacter, *via* deux processus différents, la compaction de la chromatine. D'abord, les MPT peuvent exercer une action mécanique qui va permettre l'ouverture de la chromatine par opposition des charges électriques des modifications.

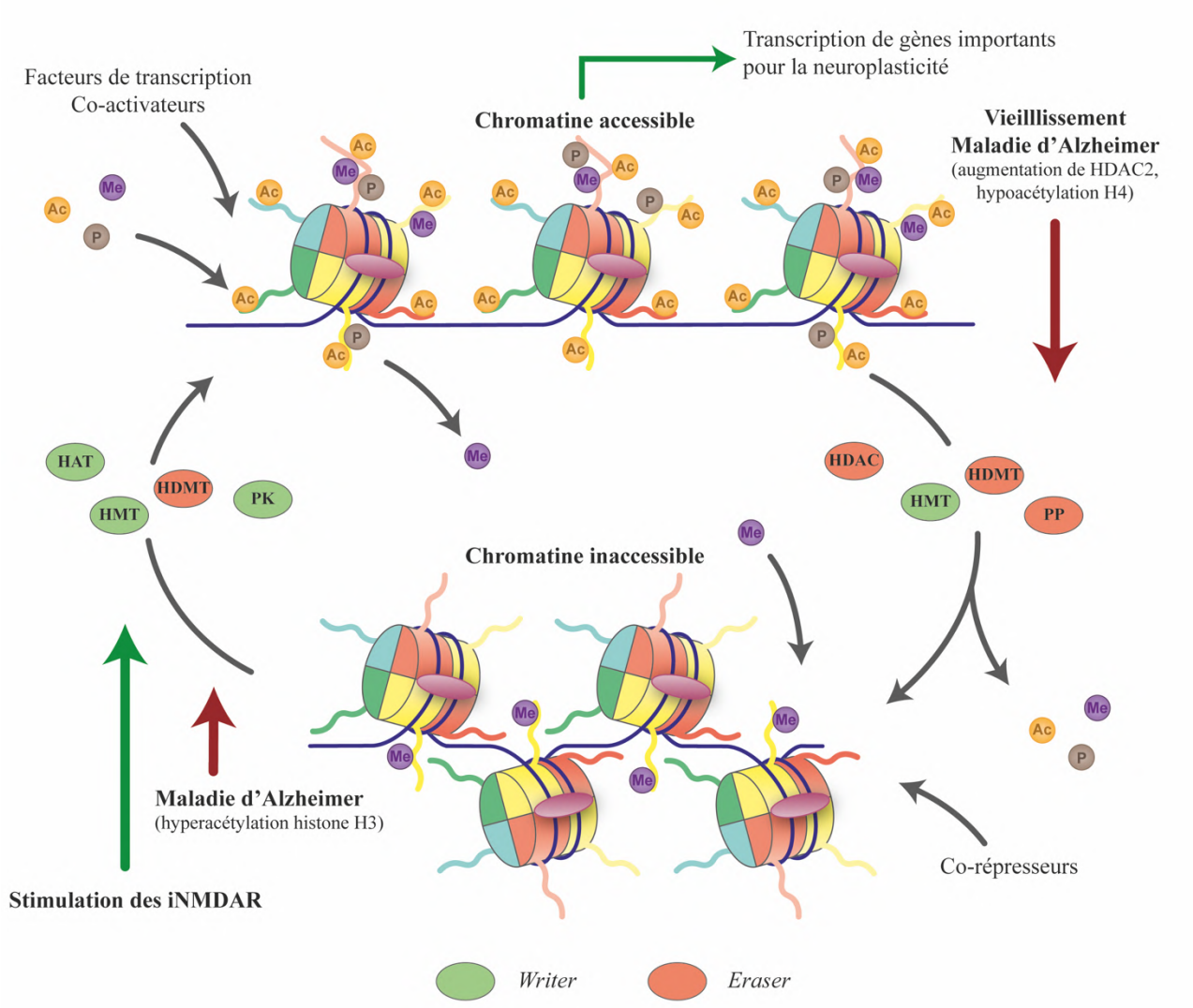


Figure 7 : Schéma de la régulation de la compaction de la chromatine par les modifications post-traductionnelles d'histones et son implication dans la physiopathologie neuronale.

L'acétylation (Ac) par les HAT, la phosphorylation (P) par les protéines kinases (PK) et la méthylation (Me) de certains résidus par les HMT des histones, permettent l'ouverture de la chromatine et son accessibilité permettant la transcription de gènes. Au contraire, la déacétylation par les HDAC, la déphosphorylation par des phosphatases (PP) ou la méthylation de certains résidus par les HMT des histones, favorisent la fermeture de la chromatine et bloque l'accès à certains gènes empêchant leur transcription. Les HDMT retirent les méthylations des histones. En conditions physiologiques ou pathologiques, les MPT d'histones jouent un rôle très important dans l'expression de gènes de la plasticité neuronale. Adapté de Gräff, 2008.

Également, les MPT vont moduler l'expression des gènes *via* un processus structural, en recrutant des protéines *readers* qui servent d'échafaudage pour des facteurs de transcription (Figure 7).

L'acétylation des histones est associée à une activation de la transcription par modification locale des charges électriques, ce qui diminue l'affinité de la queue d'histone avec l'ADN et ainsi relâche la chromatine. D'un autre côté, la méthylation des histones a un impact double sur l'activité transcriptionnelle et est associée à une activation et à une répression de la transcription, en fonction de l'histone et de l'acide aminé modifiés. Enfin, de la même manière que l'acétylation, la phosphorylation des histones est associée à une activation de la transcription. La MPT induit également une modification locale de charge provoquant une répulsion de l'ADN avec la phospho-histone, décondensant la chromatine et augmentant l'accessibilité à la machinerie de transcription (Figure 7) (Gräff & Mansuy, 2008).

2.1.2. Les modifications d'histone dans la physiopathologie neuronale

Les MPT d'histones sont les modifications les plus étudiées dans les mécanismes épigénétiques impliqués dans la physiologie neuronale. Il est maintenant possible d'obtenir des cartes de MPT d'histones dont les profils modulent l'expression de gènes, afin de maintenir la fonction spécifique d'un neurone, qu'il soit dopaminergique, GABAergique, etc… (Södersten *et al.*, 2018). L'acétylation des histones, médiée par l'activation des iNMDAR, participe à la formation de la mémoire dans l'hippocampe, *a minima* chez le rongeur. En effet, l'activation des iNMDAR induit la phosphorylation de l'HAT CBP par la kinase ERK pour acétyler l'histone H3, ouvrir la chromatine et permettre l'expression de gènes codant pour des neurotrophines, importantes pour la plasticité neuronale (comme le BDNF) (Levenson *et al.*, 2004). Dans le même sens, la déficience de la déacétylase HDAC2 dans un modèle de souris a permis de faciliter l'apprentissage et la mémorisation (Guan *et al.*, 2009). Les données suggèrent alors que l'ouverture de la chromatine par acétylation des histones est cruciale pour la plasticité synaptique. La phosphorylation d'histones joue aussi un rôle important dans la mise en place de la mémoire à long terme. En effet, dans un modèle de souris déficientes pour la protéine kinase MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase-1*), la mémoire à long terme est altérée (Chwang *et al.*, 2007). De plus, la kinase MSK1 est activée suite à une stimulation pour phosphoryler des histones (dont H3), dans des neurones hippocampiques, ce

qui va permettre l'ouverture de la chromatine et le recrutement de facteurs de transcription pour l'expression de gènes importants pour la plasticité neuronale. Enfin, il a également été montré que le facteur de transcription TLX pouvait interagir avec des HDAC lui permettant de réprimer l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules souches neurales. Cette action permet de lever le frein sur la prolifération des cellules souches neurales qui se différencient en neurones matures (Sun *et al.*, 2007)

A la vue de l'implication de ces MPT d'histones dans la plasticité neuronale, il apparait logique que leur perturbation peut être à l'origine de troubles des fonctions neuronales ou de la neurogenèse. En effet, lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires en cellules souches neurales, une marque de méthylation est retirée sur l'histone H3 pour permettre l'expression du gène *NES*, qui code pour une protéine des neurofilaments : la nestine (Burgold *et al.*, 2008). Avec l'âge, l'hyperméthylation de l'histone H3 sur des régions promotrices, est associée à une répression de la transcription de certains gènes, favorisant la neurodégénérescence (Figure 7) (Akbarian *et al.*, 2013). Ainsi, lorsque l'équilibre entre acétylation et déacétylation est perturbée, certaines maladies peuvent apparaître. Par exemple, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par une perturbation des processus d'acétylation de certaines histones. En effet, il a été observé dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (et même chez les souris âgées) un défaut d'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 12 dans certaines régions du cerveau impliquées dans la mise en place de la mémoire (Wood, 2018). Cette diminution d'acétylation découle d'une augmentation de l'expression de la déacétylase HDAC2 dans ces modèles. En parallèle, il est également retrouvé l'hyperacétylation de l'histone H3 dans les neurones du cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Schueller *et al.*, 2020). Par conséquent, la perturbation précise de certaines MPT d'histones, dans certaines régions du cerveau, engendrer le développement de la maladie d'Alzheimer (Wood, 2018).

2.2. *Méthylation et déméthylation de l'ADN*

2.2.1. Présentation des mécanismes

La modification épigénétique la plus étudiée et caractérisée est la méthylation de cytosines. La méthylation de l'ADN survient presque exclusivement dans le contexte de dinucléotides CpG (Cytosine-Guanosine). Les dinucléotiques CpG forment des clusters appelés « îlots CpG » définis par des régions de quelques centaines de bases riches en G et en C

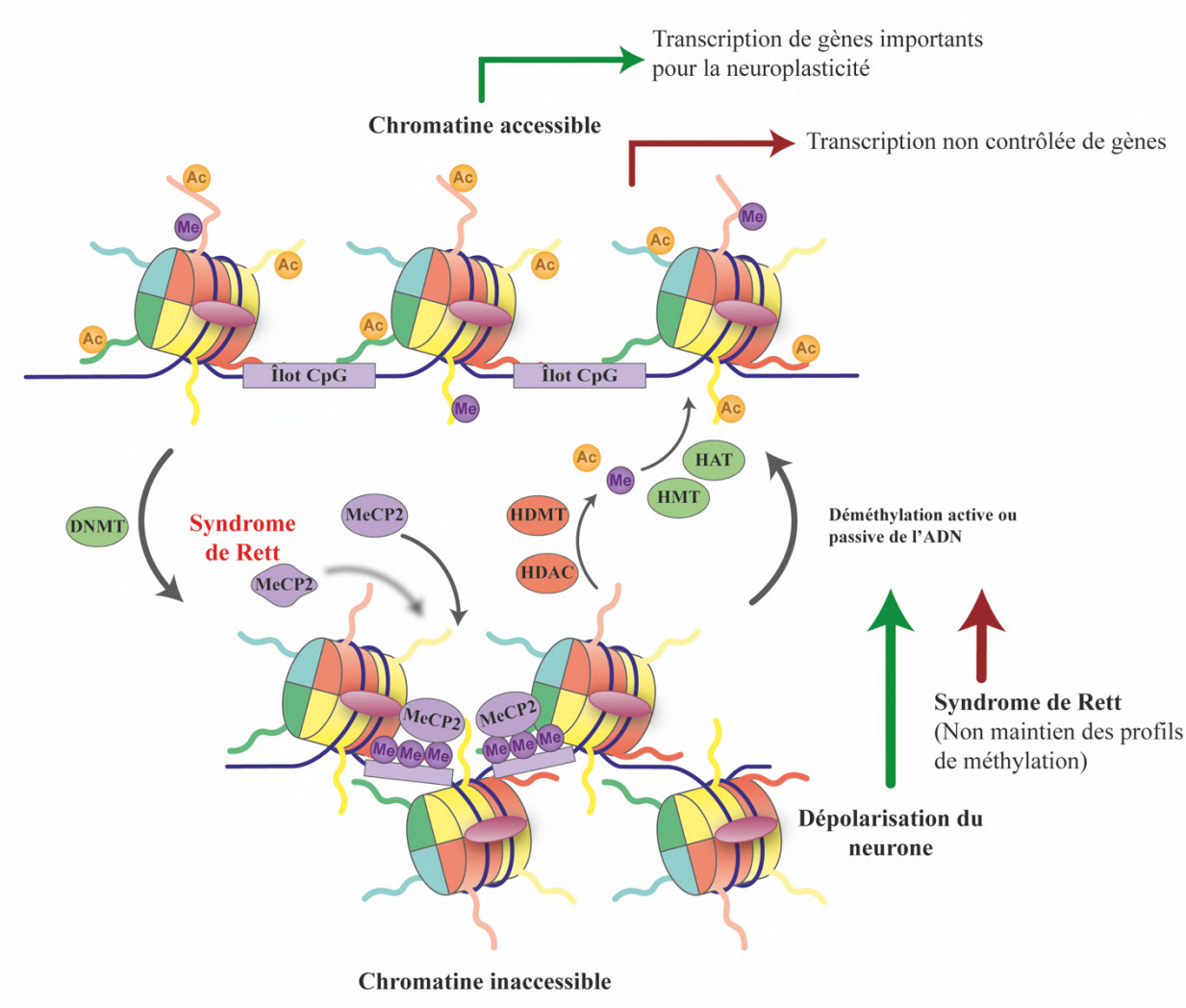


Figure 8 : Schéma de la régulation de la compaction de la chromatine par les méthylations de l'ADN et son implication dans la physiopathologie neuronale.
Les DNMT méthylent des cytosines aux niveaux de séquences riches en G et en C appelées îlots CpG. Cette modification est reconnue par la protéine MeCP2 qui va recruter des HDAC et des HDMT pour retirer les acétylations et les méthylations des histones. L'ensemble de ces modifications conduit à la fermeture de la chromatine. La déméthylation de l'ADN se fait par des mécanismes actifs ou passifs et la perte de MeCP2 va permettre aux HAT et aux HMT d'acétyler et de méthyler des histones pour permettre l'ouverture de la chromatine. La stimulation des neurones suffit à provoquer la déméthylation de l'ADN et l'ouverture de la chromatine pour permettre l'expression de gènes. Le syndrome de Rett se caractérise par une forme mutée de MeCP2 qui ne peut maintenir la chromatine fermée, conduisant à une expression non régulée de certains gènes.

(Bird, 1986). Les protéines qui catalysent la méthylation de ces cytosines sont les *DNA methyltransferase* (DNMT) et chez les mammifères les trois principales DNMT sont : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. La première a un rôle dans la reproduction des profils de méthylation existant sur le brin néosynthétisé lors de la réplication de l'ADN. Les deux autres sont plutôt spécialisées dans la méthylation *de novo* du génome en réponse aux stimuli (Quina *et al.*, 2006). Les mécanismes de déméthylation sont encore peu connus mais la déméthylation est caractérisée comme étant un phénomène passif ou actif. En effet, l'inhibition de la DNMT1 durant la réplication de l'ADN dans des cellules mitotiques permet la génération de brins hypométhylés, la déméthylation se fait alors de façon passive. La déméthylation active se ferait en suivant une série de réactions chimiques de déamination et/ou d'oxydation, faisant intervenir plusieurs facteurs (Moore *et al.*, 2013).

Les marques de méthylation sur l'ADN sont reconnues par plusieurs familles de protéines dont, la plus connue, est celle regroupant les protéines qui disposent d'un domaine de liaison au méthyl-CpG (MBD) (Buck-Koehntop & Defossez, 2013). Dans cette famille, on retrouve la protéine MeCP2 (*Methyl-CpG binding protein 2*). Un des rôles de la protéine MeCP2 est de maintenir le niveau de méthylation de l'ADN grâce à son interaction avec la protéine DNMT1. De plus, MeCP2 est capable de recruter des *histones deacetylase* (HDAC) et des *histones methyltransferase* (HMT) permettant la diminution de l'acétylation et l'augmentation de la méthylation des histones (Figure 8) (Nan *et al.*, 1998).

Finalement, la conséquence de la méthylation de l'ADN est la compaction de la chromatine bloquant l'accès aux facteurs de transcription et réprimant l'expression de gènes (Moore *et al.*, 2013). Le recrutement de la machinerie permettant la modification des histones va aussi dans le sens d'une augmentation de la compaction de la chromatine pour inhiber l'expression de gènes.

2.2.2. Les modifications de l'ADN dans la physiopathologie neuronale

Les changements de la méthylation de l'ADN ont été impliqués dans les modifications de l'expression des gènes durant la mise en place de la mémoire et plus particulièrement de la plasticité synaptique (Poon *et al.*, 2020). En effet, il a été montré que la mise en place de la mémoire dans l'hippocampe chez la souris implique la déméthylation de l'ADN pour permettre l'expression de gènes favorisant la plasticité neuronale, comme la reeline. Il est également observé, au contraire, la méthylation de gènes défavorables à la formation de la mémoire,

comme celui codant pour la protéine phosphatase-1 (PP1) (Miller & Sweatt, 2007). De plus, la formation de la mémoire chez la souris conduit à une déméthylation du promoteur du gène codant pour le BDNF via l'activation des NMDAR (Lubin *et al.*, 2008). Ces mêmes travaux suggèrent également que ces modifications sont très dynamiques puisque la modification d'expression des gènes est observée quelques heures après stimulation et retourne à un niveau basal 24h après. Une des pathologies les plus connues, qui découle d'une perturbation de ce mécanisme, est le syndrome de Rett. Cette maladie touche 1 personne sur 15 000 et résulte d'une mutation du gène *MeCP2* qui se situe sur le chromosome X. Avec qu'une seule copie, cette mutation n'est pas viable pour le fœtus au caryotype XY expliquant pourquoi cette maladie ne touche que les femmes (Liyanage & Rastegar, 2014). De façon exceptionnelle, la mutation peut survenir chez un garçon qui possède un seul gène *MeCP2*. Le tableau clinique est alors différent avec une encéphalopathie néonatale sévère responsable d'un décès précoce. Même si la protéine est exprimée dans tout l'organisme, elle est retrouvée à ses niveaux les plus élevés, dans le cerveau. Les conséquences de cette maladie sont des troubles du développement cérébral dans les premiers mois, engendrant des retards mentaux et des troubles de l'apprentissage. La protéine mutée ne peut pas remplir son rôle de *reader* des méthylations de l'ADN et ne peut plus recruter les facteurs qui lui permettent de maintenir la chromatine fermée. La chromatine a donc tendance à s'ouvrir et la transcription anarchique de certains gènes sont à l'origine des troubles du développement du cerveau (Figure 8) (Chin & Goh, 2019).

2.3. *L'interférence de l'expression génique par les ARNnc*

2.3.1. Les différents mécanismes d'interférence de l'expression génique

Un des plus récents mécanismes épigénétiques identifiés est la répression de l'expression génique associée aux ARNnc (Frías-Lasserre & Villagra, 2017). Les ARNnc sont des molécules d'ARN fonctionnelles qui sont transcrites à partir de gènes, mais non traduites en protéines. Les principales molécules d'ARNnc sont : les micro ARN (miRNA) et les petits ARN interférents (siRNA) d'une taille de moins de 30 nucléotides, et les *long non-coding RNA* (lncRNA) de plus de 200 nucléotides. Le premier niveau de régulation est l'interférence avec les transcrits.

Les siRNA et les miRNA, sous leur forme simple brin, sont capables de s'hybrider, par complémentarité de bases, partiellement ou totalement à des ARN messagers (ARNm).

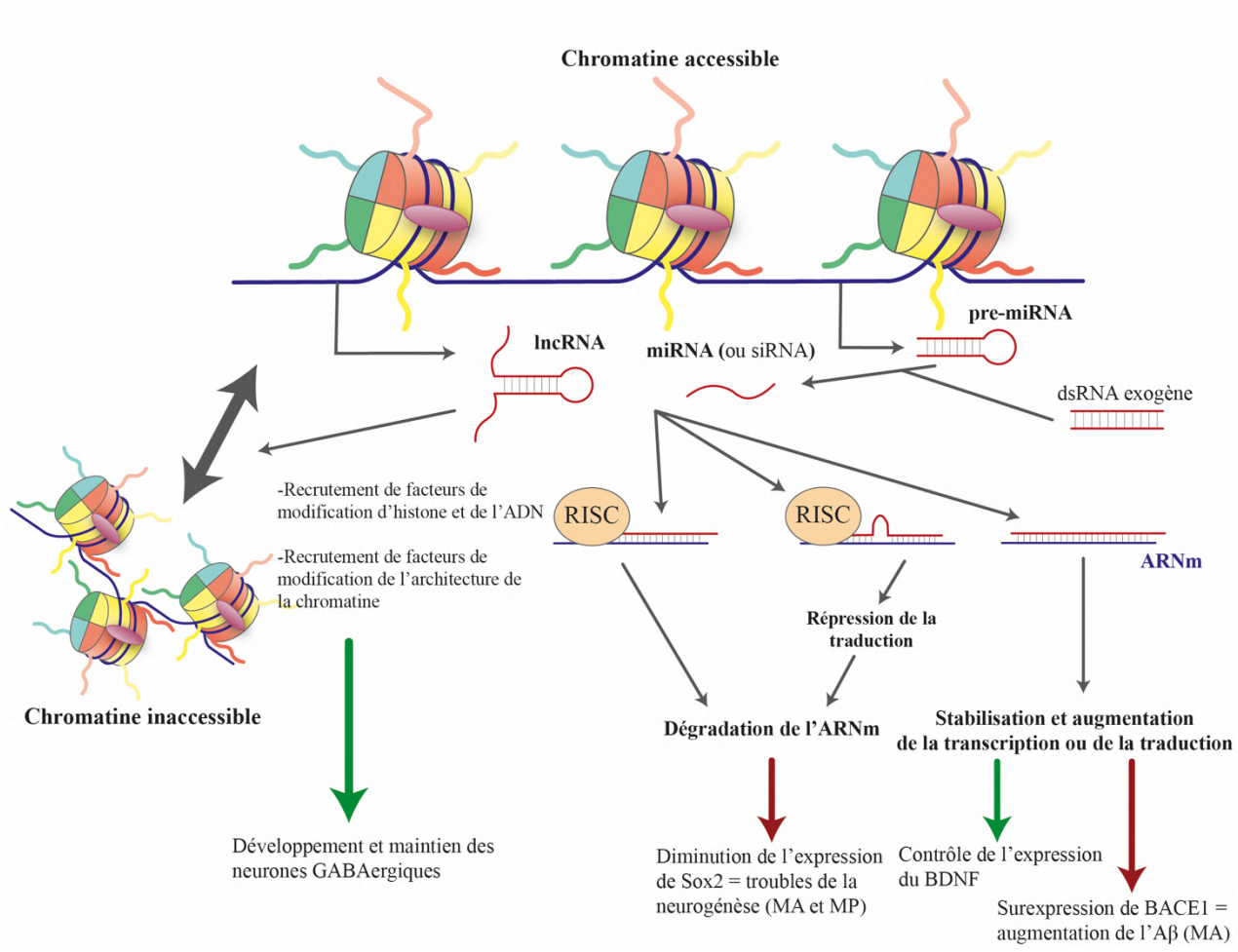


Figure 9 : Schéma de la régulation épigénétique par les ARNnc et leur implication dans la plasticité neuronale.

Les lncRNA et les siRNA ou miRNA peuvent s'hybrider avec des ARNm pour réguler leur traduction. Les lncRNA peuvent aussi interagir avec la chromatine et recruter d'autres facteurs comme des enzymes de MPT d'histones ou des protéines de l'architecture de la chromatine, afin d'en modifier leur niveau de compaction. Aβ = β-amyloïde, BACE1 = β-sécrétase 1, MA = maladie d'Alzheimer, MP = maladie de Parkinson, RISC = *RNA-induced silencing complex*,

Un complexe protéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui accompagne les ARN interférents va alors cliver l'ARNm qui sera ensuite dégradé, si l'hybridation est totale. Dans le cas où l'hybridation est partielle, la traduction est d'abord bloquée un temps puis l'ARNm finit par être dégradé. Cette régulation post-transcriptionnelle a, au final, le rôle de bloquer l'expression de protéines. Au contraire, l'hybridation de ces transcrits peut aussi avoir un rôle inverse en augmentant la transcription du gène correspondant par des mécanismes encore peu connus (Figure 9) (Wei *et al.*, 2017; Vasudevan, 2012).

Les ARNnc peuvent aussi agir sur la chromatine. Actuellement, tous les mécanismes ne sont pas très bien caractérisés mais il est connu que les ARNnc participent aux processus de MPT des histones et de méthylation de l'ADN (Wei *et al.*, 2017). D'une part, en interférant avec les ARNm qui codent des protéines impliquées dans les processus de modification de la chromatine. D'autre part, en servant de « guide » pour amener des facteurs à proximité de la chromatine. C'est le cas des lncRNA dont le plus connu Xist (*X-inactive specific transcript*) permet, en recrutant des facteurs cellulaires, l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme (Lee, 2011). Les lncRNA sont aussi capables de participer à l'architecture de la chromatine en liant des protéines qui peuvent se lier à l'ADN et l'ARN, permettant de réguler ses niveaux de compaction (Figure 9) (Morlando & Fatica, 2018).

2.3.2. Les contributions des ARNnc à la physiopathologie neuronale

Des lncRNA permettent de favoriser la transcription de la protéine de conversion du glutamate en GABA, permettant de maintenir la fonction des neurones GABAergiques (Wei *et al.*, 2018). Il existe aussi des lncRNA complémentaires de l'ARNm du BDNF qui peuvent être transcrits pour permettre un contrôle de la traduction de ces ARNm et donc de la quantité de BDNF exprimé. Des maladies neurologiques peuvent apparaître lorsque l'expression de lncRNA est modifiée (Wei *et al.*, 2018). C'est le cas de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson. Dans les deux cas, des lncRNA complémentaires d'ARNm de Sox2 sont surexprimés, réduisant la quantité de Sox2, une protéine participant à la neurogenèse (Wei, 2018). De plus, dans la maladie d'Alzheimer, la surexpression d'un lncRNA complémentaire de l'ARNm de la β-sécrétase 1 (BACE1), à l'origine de la formation du peptide β-amyloïde (Aβ), stabilise l'ARNm de BACE1. Cette stabilisation augmente la traduction de BACE1 qui va générer plus d'Aβ et donc la formation d'agrégats toxiques pour les neurones (Figure 9) (Faghihi *et al.*, 2008).

Dans les cellules qui se divisent, les cellules filles semblent hériter d'une partie de ces modifications épigénétiques acquises par la cellule mère durant sa vie (Zaidi, 2010). Cela permet aux cellules filles d'avoir en leur possession les marques épigénétiques qui vont leur permettre d'être déjà « optimisées ». Néanmoins, dans le cas des neurones, des cellules post-mitotiques soumises à de nombreux stimuli, nous avons vu que la régulation épigénétique tient un rôle encore plus important, car facilitant l'adaptabilité des cellules. Également, des perturbations de ces mécanismes épigénétiques peuvent être la cause de troubles neurologiques.

Il apparait donc essentiel de continuer à identifier les perturbations de ces mécanismes. Depuis peu, un nouveau mécanisme épigénétique essentiel pour les fonctions neuronales a émergé : les cassures double-brin dans l'ADN des neurones.

3. LES CASSURES DOUBLE-BRIN : NOUVEAUX ACTEURS EPIGENETIQUES

3.1. *Les cassures double-brin*

Il est connu que l'ADN, unité de base de l'hérédité, est une molécule intrinsèquement réactive et très susceptible à des modifications chimiques par des agents endogènes et exogènes. Ainsi ces agents peuvent être la cause de dommages à l'ADN en induisant des cassures. Ces cassures consistent à la rupture de brin de la molécule d'ADN et peut s'accompagner de la perte de nucléotides. Les cassures sont prises en charge par des mécanismes complexes de réparation, appelés la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). Ces cassures peuvent n'affecter qu'un seul brin et sont globalement bien réparées par les mécanismes de réparation propres aux cassures simple-brin. Ces mécanismes utilisent alors le brin complémentaire intact comme support pour la réparation par complémentarité de bases. Par contre, les cassures qui touchent les deux brins (CDB) sont des dommages à l'ADN plus sévères et ont des conséquences plus importantes. Elles ont leurs propres mécanismes de réparation plus ou moins efficaces qui peuvent générer des mutations (Chatterjee & Walker, 2017). Nous ne nous intéresserons qu'aux CDB pour la suite de cette partie.

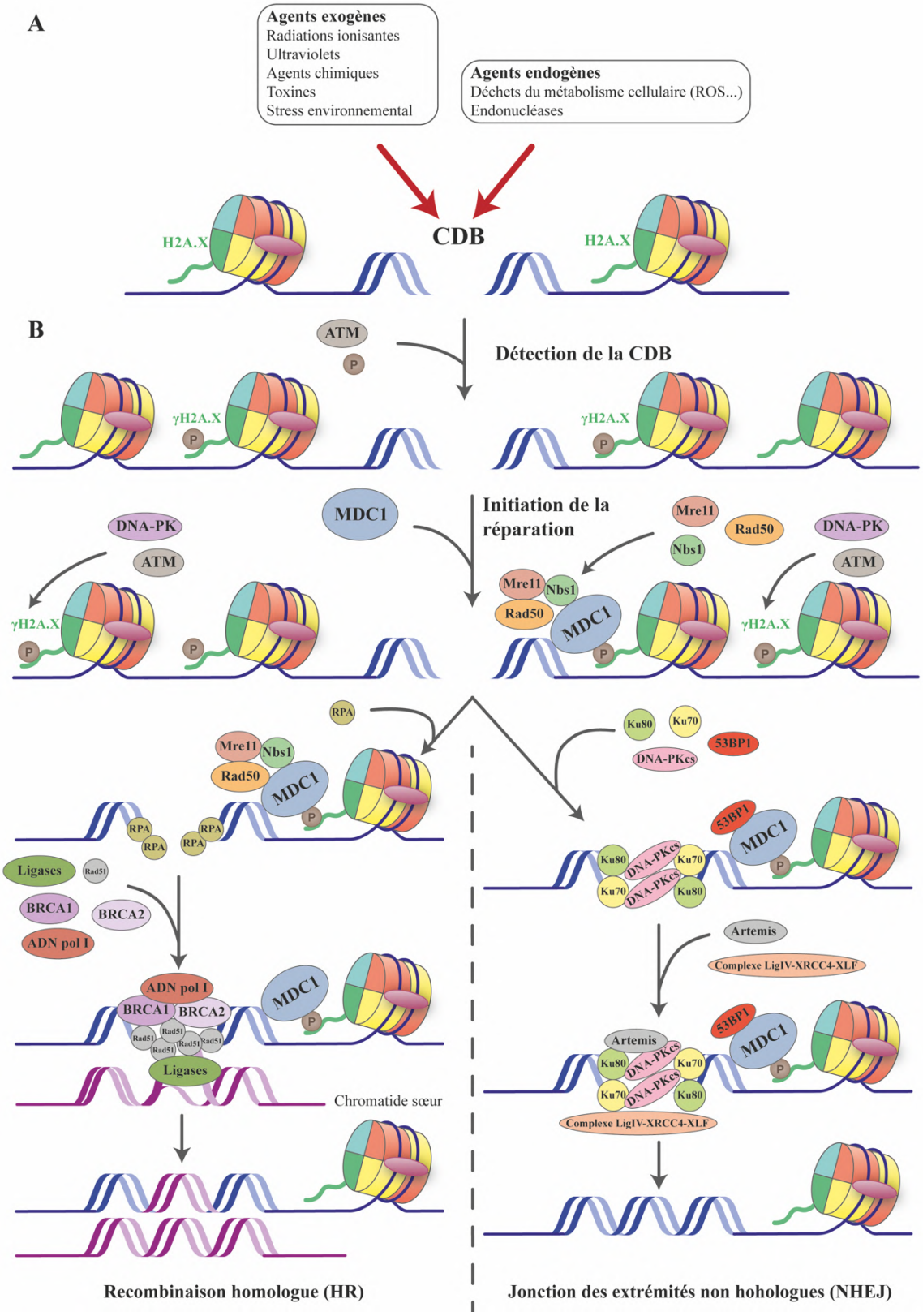


Figure 10 : Schéma simplifié de l'initiation de cassures double-brin dans l'ADN et des mécanismes de réparation par recombinaison homologue ou par la jonction des extrémités non homologues.

(A) Agents endogènes ou exogènes pouvant causer des CDB dans l'ADN. **(B)** Représentation simplifiée des principales étapes et acteurs des deux voies majoritaires de réparation des CDB en cellules mitotiques (HR) ou mises en quiescence (NHEJ). Adapté de Mazumder, 2014 (Mazumder *et al.*, 2014) et Panier, 2013.

3.1.1. De la génération à la réparation

Origines des cassures double-brin de l'ADN

Les origines des dommages à l'ADN ne sont pas exclusives des cassures simple-brin ou des CDB. Les agents exogènes qui peuvent induire des cassures sont les radiations ionisantes, les rayonnements ultraviolets, des agents chimiques modifiant les bases, les toxines ou le stress environnemental comme l'extrême chaud ou froid. Également, les déchets du métabolisme cellulaire comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent modifier des bases, ce qui nécessitera une réparation passant par une étape de cassure (Figure 10A) (Mehta & Haber, 2014).

Il existe cependant des cassures qui ne sont pas accidentelles mais provoquées et extrêmement bien régulées et contrôlées par des agents endogènes. Ces processus sont contrôlés par des endonucléases spécifiques qui jouent un rôle dans la recombinaison V(D)J des immunoglobulines ou les *crossing-over* durant la mitose et la méiose. D'autres endonucléases permettent la décondensation de la chromatine lors de la réplication (Figure 10A). Ces mécanismes complexes et très régulés sont médiés par des topoisomérases. Les topoisomérases sont une famille de protéines capables d'induire des cassures simple ou double-brin, de façon transitoire, afin de faire traverser des segments d'ADN à travers d'autres pour permettre de relâcher la molécule. Elles disposent également d'une activité ligase pour leur permettre de recoller les cassures qu'elles ont créées (Bush *et al.*, 2015).

Les CDB sont la forme la plus sévère de dommages à l'ADN et peuvent être source de recombinaisons entre chromosomes dans des cellules en phase de mitose (Pfeiffer *et al.*, 2000). Il est estimé cependant qu'une cellule est soumise à au moins 10 et jusqu'à 50 CDB par jour (Vilenchik & Knudson, 2003). Ainsi, en condition physiologique, des mécanismes de réparation se mettent en place très rapidement après la détection des CDB. Si une cellule vient à accumuler trop de CDB ou que les mécanismes de réparation ne sont pas efficaces, alors les cellules peuvent entrer en apoptose ou accumuler des mutations jusqu'à devenir cancéreuses. Ces processus font intervenir de nombreuses voies et facteurs, aussi nous resterons focalisés sur les principaux acteurs d'intérêts pour notre étude.

Les voies de réparation des cassures double-brin

Il existe deux voies différentes pour réparer des CDB et qui dépendent de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule (Iyama & Wilson, 2013). Pour les cellules qui sont entrées dans un cycle de mitose ou de méiose, la réparation se fait principalement par

recombinaison homologue (*homologous recombination*, HR) pour réparer les CDB post-réplicatives (Figure 10A). Cette voie implique d'utiliser la chromatide sœur de la chromatide endommagée, issue de la duplication des chromosomes, comme matrice pour réparer les séquences. Cette voie est donc considérée comme très fidèle et peu génératrice d'erreurs bien que l'étape initiale de la voie consiste en une résection de régions de l'ADN au niveau de la cassure (Wright *et al.*, 2018). Pour les cellules en phase G1 ou quiescentes, la voie obligatoire est la jonction des extrémités non homologues (*non-homologous end joining*, NHEJ) qui ne nécessite pas de chromatide sœur comme matrice puisqu'elle permet directement la religation des extrémités coupées (Figure 10B). Le problème est que toutes les extrémités d'ADN coupées ne sont pas immédiatement compatibles à une ligation, c'est pourquoi cette voie utilise des enzymes pour modifier les extrémités jusqu'à ce qu'elles soient compatibles à la ligation, sans résection majeure apparente. Mais ces mécanismes ont quand même la possibilité d'introduire des mutations par insertion ou délétion de nucléotides ce qui rend la réparation potentiellement moins fidèle que si elle avait été réalisée par la voie HR. Cette voie dispose cependant de mécanismes permettant de diminuer au maximum les erreurs pendant la réparation. En effet, il a été montré que l'étape de ligation n'était initiée que lorsque les brins étaient bien alignés et compatibles (Stinson *et al.*, 2020).

L'évènement le plus précoce identifié au niveau d'une CDB est la rapide (quelques minutes) et étendue (à des centaines de kilobases autour de la CDB) phosphorylation d'un variant de l'histone H2A : H2A.X, pour donner la forme phosphorylée γH2A.X (Rogakou *et al.*, 1998). Cette phosphorylation d'histone résulte de la détection d'une CDB, première étape de la mise en place de la DDR. L'histone H2A.X est phosphorylée par la kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) qui est activée suite à la génération d'une cassure (Burma *et al.*, 2001). L'histone γH2A.X est une protéine qui va permettre, *via* son interaction avec une protéine plateforme MDC1, le recrutement de facteurs impliqués dans les voies HR et NHEJ (Stucki & Jackson, 2006). Il permet, entre autres, le recrutement et la stabilisation sur le site de la cassure, du complexe MRN composé des protéines Mre11-Nbs1-Rad50 qui contribuent aux deux voies en jouant un rôle crucial dans la détection et la signalisation de la lésion. Ce complexe « multifonctions » conduit à l'arrêt du cycle cellulaire (pour les cellules mitotiques), aiguille vers une voie spécifique de réparation et initie la reconstruction de la molécule d'ADN (Paull *et al.*, 2000). Ce complexe va permettre à son tour de recruter les kinases ATM et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) qui vont phosphoryler les variants d'histones H2A.X proches de la cassure.

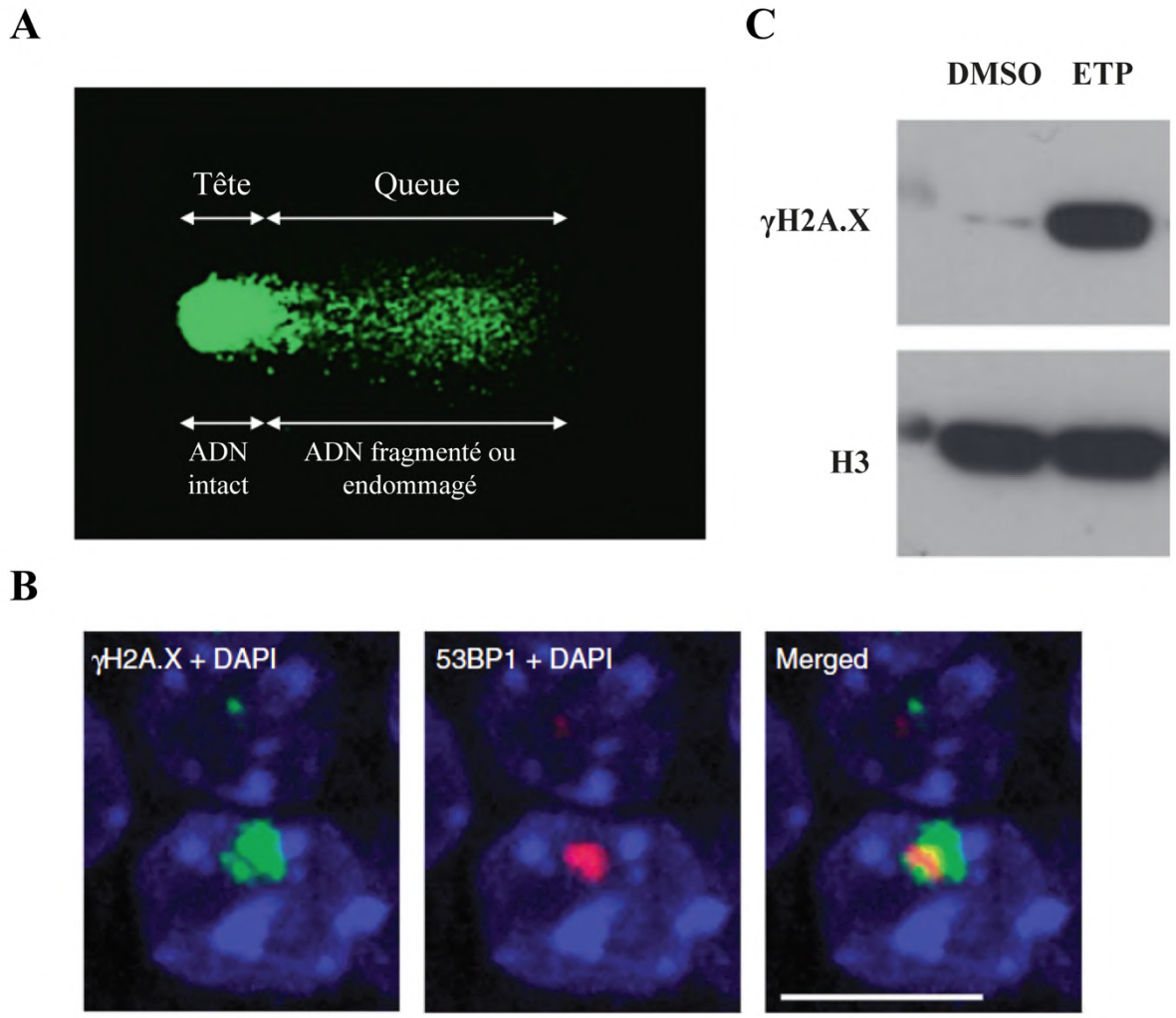


Figure 11 : Exemples de techniques permettant d'étudier les cassures double-brin.
Les figures ci-dessus sont issues d'expériences réalisées sur des neurones.
(A) Un neurone endommagé typique en *Comet assay*. **(B)** Marquages γH2A.X et 53BP1 colocalisés formant des foyers au niveau des CDB. Barre d'échelle = 10 µm. **(C)** Détection de γH2A.X par *Western blot* sur des neurones traités ou non avec de l'étoposide (ETP), un inducteur de CDB. **(A)** et **(C)** de Pao, 2019 ; **(B)** de Suberbielle, 2013.

Ceci permet l'amplification de la signalisation au niveau de la cassure et l'agrandissement de la plateforme de recrutement des facteurs de réparation (Stucki & Jackson, 2006). D'autres protéines sont ensuite recrutées sur le site de la lésion comme les protéines BRCA1 (*breast cancer associated 1*) ou 53BP1 (*p53 binding protein 1*) pour permettre cette fois-ci le recrutement de protéines ligases, endonucléases et de protéines de stabilisation qui vont participer directement à la réparation de l'ADN (Anderson *et al.*, 2001; Stucki & Jackson, 2006). Les protéines BRCA1 et 53BP1 sont impliquées dans le choix de la voie de réparation utilisée pour réparer les CDB et ce choix dépend en partie de la phase dans laquelle se trouve la cellule lésée, mais également de l'initiation ou non d'une étape de résection de fragments d'ADN (Daley & Sung, 2014; Iyama & Wilson, 2013). Il est communément admis que BRCA1 dirigera la réparation vers la voie HR alors que 53BP1 favorisera plutôt la voie NHEJ. Cependant, ces « dogmes » ont récemment été remis en cause avec la découverte que BRCA1 intervenait également dans les mécanismes de fidélité de la voie de réparation NHEJ dans des cellules post-mitotiques (Panier & Boulton, 2014; Saha & Davis, 2016). Cependant, peu d'études se sont intéressées au rôle que pouvait avoir BRCA1 dans la réparation des CDB par la voie NHEJ dans des cellules post-mitotiques.

De plus, une autre protéine, PARP1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*) peut être recrutée au niveau de la CDB et entrer en compétition avec des protéines de la voie classique NHEJ pour diriger la réparation vers une voie dite alternative de NHEJ (Yang *et al.*, 2018). Les complexes ainsi recrutés par des cascades de phosphorylations et d'interactions vont permettre de résoudre la lésion par religation des brins d'ADN (Figure 10B).

Méthodologie et modèles

D'un point de vue méthodologique, un certain nombre de techniques permettent de visualiser les CDB afin d'étudier leur nombre et les mécanismes de recrutement des différents intervenants. Une de ces techniques est le *Comet assay*, qui permet d'évaluer la fragmentation de l'ADN. Le principe repose sur le fait que des cellules, ayant l'ADN fragmenté et chargé négativement, va voir ses fragments migrer dans de l'agarose si on applique un courant électrique. L'ADN est ensuite marqué par un intercalant de l'ADN comme le *SyBR green*. Plus la cellule aura de fragments petits issus de cassures de l'ADN, plus le profil de migration représentera une trainée ou une « queue de comète ». La longueur de la trainée donne donc une indication sur le degré de fragmentation de l'ADN de la cellule (Figure 11A) (Pao *et al.*, 2019).

Par ailleurs, les protéines γH2A.X et 53BP1 sont capables de former des foyers ou *foci* au niveau du site de la CDB. Des techniques d'immunomarquage permettent leur visualisation,

leur localisation et leur quantification (Figure 11B) (Rothkamm *et al.*, 2015; Popp *et al.*, 2017). Le variant d'histones γH2A.X, forme phosphorylée de l'histone H2A.X, est en soit considérée comme un marqueur spécifique des CDB. Il peut donc aussi être étudié et quantifié par *Western blot* (WB) (Figure 11C) (Pao *et al.*, 2019). Par contre, la protéine 53BP1 est exprimée de façon constitutive globalement par toutes les cellules, mais ce n'est que sa relocalisation sous forme de foyers sur le site de la lésion qui en fait un marqueur des CDB.

Il est très facile de créer des CDB ou d'induire la DDR, par des traitements pharmacologiques (étoposide ou bléomycine) ou par irradiation. Il est par contre, pour l'heure, impossible de prévenir ni l'apparition d'une CDB, ni de bloquer complètement la DDR. Des stratégies ont donc été mises en place pour contourner ces difficultés. Un modèle intéressant pour étudier la DDR est le modèle H2A.X *knock-out* (KO). L'objectif est, en absence de protéines H2A.X, de bloquer l'étape initiale de détection et de signalisation d'une CDB par l'impossibilité de phosphoryler le variant d'histone. De façon surprenante, la déficience de l'histone H2A.X chez les souris n'est pas létale, mais celles-ci sont plus sensibles aux radiations, ont des retards de développement et sont immunitairement déficientes (Celeste *et al.*, 2002). Ces souris présentent, dans les cellules mitotiques, des défauts dans la stabilisation des foyers de réparation aux niveaux des CDB, à cause d'un défaut de rétention des facteurs de réparation, comme Nbs1, 53BP1, BRCA1, qui constituent ces foyers (Celeste *et al.*, 2003). Ainsi, la phosphorylation des histones H2A.X est un facteur déterminant de signalisation dans l'initiation de la DDR et la stabilisation des complexes de réparation. Ce modèle apparait donc intéressant pour étudier le rôle de la signalisation des CDB. Cependant, la déficience dans tout l'organisme, dès le développement embryonnaire, des histones H2A.X présentent de trop grandes conséquences sur le développement. Nous discuterons plus tard d'un ajustement de ce modèle qui nous a servi durant ma thèse pour étudier le rôle de cette signalisation dans les neurones.

3.1.2. Les cassures double-brin, un mécanisme épigénétique ?

Impact sur les modifications post-traductionnelles des histones

La génération d'une cassure implique inexorablement une modification de l'architecture de la chromatine. En effet, la chromatine doit être dans un état ouvert mais réprimé pour permettre son accessibilité aux facteurs de réparation. Puis, la chromatine doit revenir dans sa conformation initiale après la réparation, sans autoriser de transcription erronée de gènes. Cette modulation de l'ouverture de la chromatine se fait par l'intermédiaire de protéines de

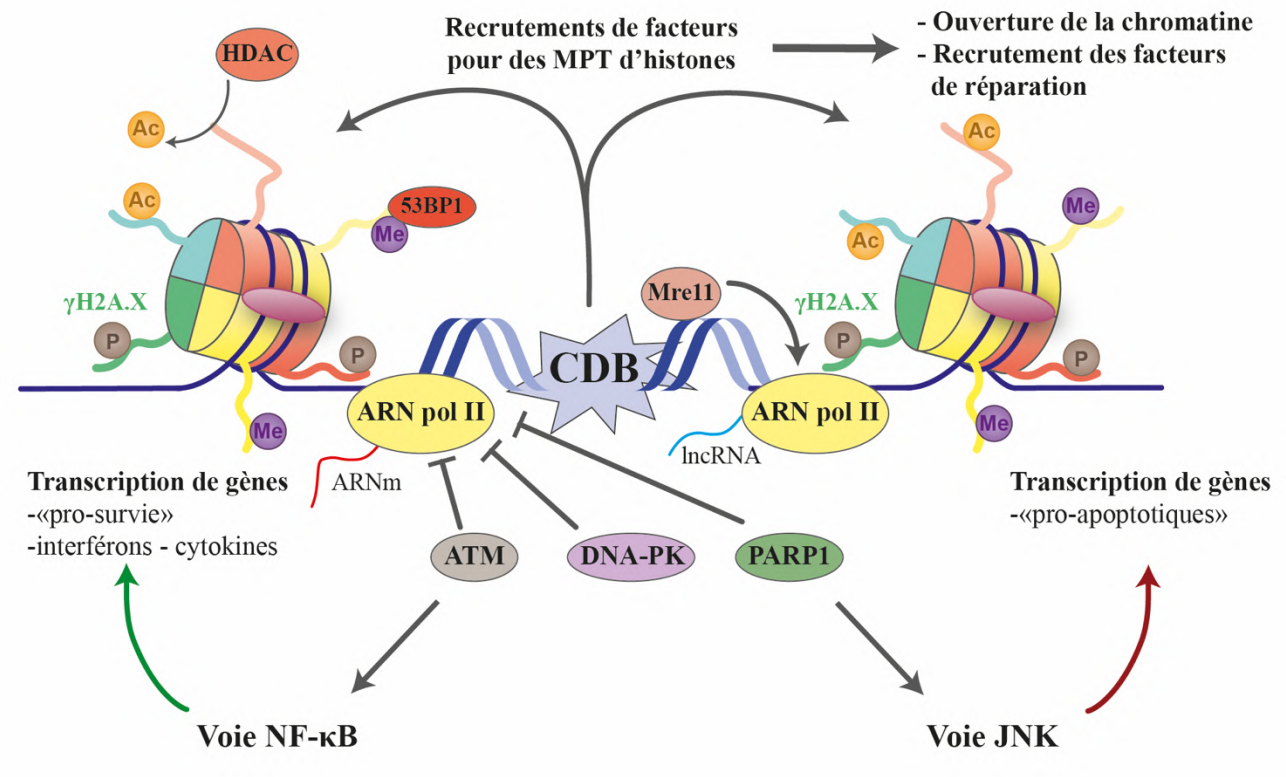


Figure 12 : Rôle épigénétique des cassures double-brin dans la modulation de l'expression des gènes.

Les CDB recrutent des facteurs modifiant les histones permettant l'ouverture de la chromatine, ce qui facilitent le recrutement des facteurs de réparation. Elles activent aussi des voies de signalisation qui, en fonction de la gravité, favorisent l'expression de gènes de survie ou d'apoptose. Les protéines ATM, DNA-PK ou PARP1 (*poly (ADP-ribose) polymerase*) bloquent la transcription des gènes aux niveaux de CDB en stoppant ou en induisant la dégradation l'ARN polymérase II (ARN pol II). La protéine Mre11 est recrutée au niveau des CDB et peut recruter l'ARN pol II pour induire la transcription de lncRNA, en aval de la cassure.

remodelage de la chromatine mais aussi de MPT d'histones (Rossetto *et al.*, 2010). En effet, dès la détection de la CDB, la phosphorylation du variant d'histone H2A.X est en soi une première MPT. A chaque étape de la réparation, les protéines recrutées par les complexes sur le site de la cassure modifient les histones à proximité. Par exemple, dans les phases initiales de la réparation, l'histone H4 est méthylée sur sa lysine 40 ce qui favorise le recrutement de la protéine 53BP1 (Figure 12) (Pei *et al.*, 2011). Aussi, la déacétylation à certaines positions des histones H3 et H4 apparaissent rapidement après l'induction d'une CDB sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires de neurones. En effet, les HDAC1 et 2 ont été impliquées dans cette déacétylation, faisant la promotion de la réparation des CDB et plus particulièrement par la voie NHEJ (Miller *et al.*, 2010; Pao *et al.*, 2019).

Activation de voies de signalisation

Les protéines ATM et PARP1 recrutées et activées précocement sur le site de la CDB ont aussi un impact sur des protéines de signalisation nucléaire. En effet, la protéine ATM peut phosphoryler la protéine, gardienne du génome, p53 et activer de façon non canonique la voie NF-κB (*nuclear factor-kappa B*). Le complexe NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. L'activation de cette voie permet la transcription de gènes pro-survie de la cellule, mais également de gènes codant des protéines de l'immunité innée comme des interférons et des cytokines (Roos *et al.*, 2016; Dunphy *et al.*, 2018). Si les CDB s'accumulent, ce sont d'autres voies qui s'activent *via* l'activation de la protéine PARP1 en plus de celle d'ATM, comme la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), qui vont plutôt conduire à l'expression de gènes pro-apoptotiques (Figure 12) (Roos *et al.*, 2016).

Répression de la transcription

Lors de la génération de CDB dans l'ADN, il est important pour la cellule d'adapter sa stratégie de transcription, au niveau de la cassure, pour permettre sa réparation. En effet, arrêter la transcription à proximité d'une CDB permet de retirer les facteurs impliqués dans la transcription pour permettre aux facteurs intervenant dans la réparation, d'accéder au site de la lésion pour former les gros complexes de réparation.

Les protéines ATM, DNA-PK et PARP1, qui interviennent précocement dans les mécanismes des voies de réparation HR et NHEJ remplissent ce rôle (Caron *et al.*, 2019a). D'abord, la protéine ATM qui, à la suite du recrutement de nombreuses protéines et de MPT, permet de mettre en pause l'ARN polymérase II pour arrêter la transcription du gène à proximité de la cassure (Shanbhag *et al.*, 2010). Ensuite, la protéine DNA-PK est capable de recruter une

ubiquitine ligase en direction de l'ARN polymérase II, qui est en train de transcrire le gène lésé par une CDB. La polyubiquitination de l'ARN polymérase II provoque sa dégradation par le protéasome, laissant la place pour les protéines de la voie NHEJ (Caron *et al.*, 2019b). Enfin, la protéine PARP1 peut modifier l'ARN polymérase II, qui transcrit alors un gène à proximité, par PARylation (ajout de poly (ADP-ribose)). Cette modification permet le recrutement d'un complexe protéique qui bloque l'élongation de la transcription en cours (Figure 12) (Polo, 2017).

Activation de la transcription

Alors qu'il est évident que la transcription est réprimée à proximité des CDB, il est apparu récemment que la transcription pouvait aussi être initiée au niveau de CDB. En effet, dans certains cas, qui ne sont pas encore bien établis, la protéine Mre11 du complexe MRN peut recruter l'ARN polymérase II en aval de la CDB pour transcrire des lncRNA (Caron *et al.*, 2019a). Après modifications par les mécanismes de génération des miRNA, ces transcrits participent au recrutement de facteurs de réparation, tel que 53BP1, sur le site de la cassure.

De plus, des CDB endogènes peuvent aussi participer à l'activation de la transcription de certains gènes. En effet, la topoisomérase IIβ (TOP2β) est une topoisomérase capable de générer des CDB transitoires pour décondenser la chromatine. Il a été montré lors d'une stimulation de cellules avec de l'œstrogène, ses récepteurs migrent dans le noyau, accompagnés de la TOP2β. La fixation du récepteur au promoteur de gènes inductibles par l'oestrogène, en présence de la TOP2β induit la génération d'une CDB qui permet le recrutement de la machinerie de réparation mais aussi de la machinerie de transcription, qui va transcrire le gène activé (Figure 12) (Ju *et al.*, 2006).

Ainsi, la génération de CDB a pour « effet secondaire » la modification de la chromatine et la répression de gènes avec pour seule finalité la décondensation de la chromatine afin de favoriser la réparation de la lésion. Récemment, des éléments émergent quant à un rôle direct et contrôlé des CDB sur l'expression de gènes. Si cela s'avérait être confirmé et généralisé à plusieurs types cellulaires, les CDB pourraient être considérées comme un mécanisme épigénétique à part entière.

Jusqu'à présent, les CDB ont toujours été étudiées dans des lignées cellulaires ou tout du moins dans des cellules mitotiques. Un nouveau champ de recherche s'est ouvert récemment avec l'étude des CDB dans des cellules post-mitotiques, les neurones. Pour preuve, il n'est retrouvé qu'une centaine de références maximum sur les 5 dernières années, avec les mots clés

« *dna double strand break* » et « *neuron* ». De façon intéressante, quelques études mettent en évidence un rôle majeur des CDB dans le fonctionnement des neurones.

3.2. *Un rôle essentiel dans le fonctionnement des neurones*

3.2.1. Les cassures double-brin neuronales : délétères mais pas que !

Les neurones étant des cellules post-mitotiques, les CDB sont d'autant plus dangereuses si elles ne sont pas efficacement réparées que les neurones n'ont pas la possibilité de réparer leur ADN en utilisant la voie HR. La voie majoritaire utilisée est la voie NHEJ, une voie considérée alors comme mutagène (Iyama & Wilson, 2013). C'est pourquoi les CDB ont toujours été considérées, en neurosciences, comme délétères pour les neurones et que l'accumulation de dommages et d'erreurs de réparation avec le temps serait responsable de la neurodégénérescence liée à l'âge (Madabhushi *et al.*, 2014). Cependant, il est apparu que les CDB pouvaient jouer un rôle plus crucial dans les fonctions neuronales.

Dans un premier temps, les CDB ont été impliquées dans l'expression de gènes lors de la différenciation des neurones. Durant la différentiation les étapes de différenciation, la TOP2β est de plus en plus exprimée dans le neurone (Watanabe *et al.*, 1994). Ainsi la TOP2β a été identifiée comme étant recrutée sur des régions promotrices, par une méthylation d'histones, caractéristique d'une activation de la transcription de gènes. Les cassures générées par la TOP2β permettent l'expression de gènes impliqués dans la transition entre progéniteur neuronal et neurone post-mitotique, accompagnant la sortie du cycle cellulaire (Tiwari *et al.*, 2012). Un défaut en TOP2β provoque alors une mort prématurée des neurones post-mitotiques.

3.2.2. L'équilibre cassure double-brin/réparation : essentiel pour les fonctions neuronales

Depuis maintenant moins de 10 ans, on sait que les CDB ont un rôle crucial, cette fois-ci pour les neurones matures non mitotiques. La stimulation d'un neurone induit l'expression de gènes importants pour son développement, comme discuté plus tôt et qui est appelée la plasticité neuronale. Mais cette stimulation provoque également la phosphorylation des histones H2A.X, marqueurs des CDB (Crowe *et al.*, 2006; Suberbielle *et al.*, 2013). La question évidente sous-

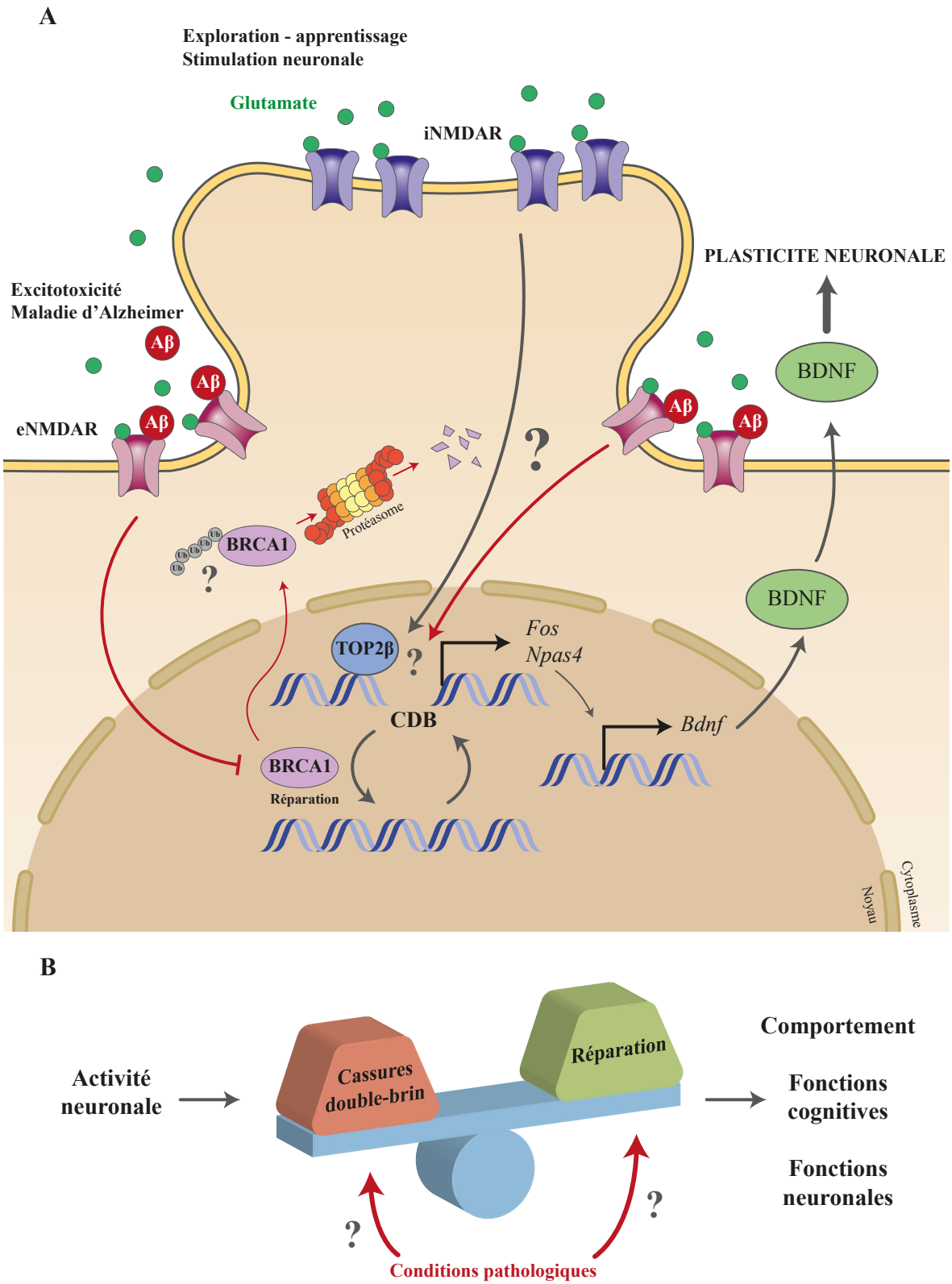


Figure 13 : Le rôle des cassures double-brin induites par la stimulation dans la plasticité neuronale.

(A) Schéma des mécanismes connus mis en jeu dans la génération et la réparation des CDB induites par la stimulation et de la perturbation de ces mécanismes dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. **(B)** Importance de l'équilibre entre génération de CDB induites par la stimulation et leur réparation efficace dans les fonctions cognitives et neuronales.

jacente était donc de savoir si les CDB générées par la stimulation pouvaient être responsables de l'expression de ces gènes.

Sur des cultures de neurones *in vitro*, une stimulation à des doses physiologiques des neurones avec du NMDA, induit une augmentation transitoire des CDB qui sont réparées dans les 4 heures, montrant une grande rapidité dans la prise en charge de ces lésions (Suberbielle *et al.*, 2013). De plus, la stimulation des iNMDAR induirait un recrutement de la TOP2β, créant des CDB, sur des régions promotrices de gènes impliqués dans la réponse précoce à la stimulation (Fos, Npas4…) (Madabhushi *et al.*, 2015). Ces gènes sont des facteurs de transcription précoces qui permettent d'induire la transcription de facteurs importants pour la plasticité neuronale comme le BDNF (Figure 13A). Encore aujourd'hui, les mécanismes intermédiaires entre la stimulation des iNMDAR et l'induction d'une CDB par la TOP2β (ou une autre endonucléase non caractérisée) sont inconnus.

Sur des modèles de souris *in vivo*, des stimulations ciblées ont été réalisées pour étudier la spécificité de l'induction de ces CDB. Une stimulation visuelle à l'œil droit induit une augmentation des CDB exclusivement dans les neurones de l'aire visuelle gauche, en suivant le chiasma optique. Le caractère transitoire a aussi été mis en évidence dans des expériences d'exploration de nouvel environnement. Les souris qui explorent un nouvel environnement voient le nombre de neurones présentant des CDB dans les régions hippocampiques, augmenter. Une fois l'exploration arrêtée, le niveau de CDB revient au niveau basal très rapidement (24h après arrêt de l'exploration) (Suberbielle *et al.*, 2013). Des études plus fines sur les mécanismes de réparation de ces CDB ont été conduites, suggérant, paradoxalement, le rôle majeur d'une protéine impliquée principalement dans la voie HR, BRCA1 (Figure 13A) (Suberbielle *et al.*, 2015). L'inhibition de l'expression de la protéine BRCA1 dans les neurones du cerveau de la souris par technique de *shRNA* provoque alors une accumulation pathologique des CDB induites par une stimulation physiologique, qui se traduisent par des troubles de l'apprentissage et de la mémoire.

Pris dans leur ensemble, ces résultats ont mis en lumière que l'augmentation physiologique de l'activité cérébrale augmente transitoirement les CDB dans l'ADN des neurones, sans mort neuronale associée. En condition non pathologique, les CDB sont rapidement réparées et leur niveau revient à l'état basal. L'équilibre entre génération de CDB, permettant une expression de gènes importants pour la plasticité neuronale et de mécanismes de réparation rapides et efficaces jouent un rôle majeur dans la physiologie neuronale.

Cet équilibre est déterminant pour garantir la plasticité neuronale nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémorisation et plus généralement au bon fonctionnement du cerveau (Figure 13B). Cependant de nombreuses inconnues existent encore et méritent d'être étudiées en détail. Pour l'instant, aucun intermédiaire ou facteur n'a été identifié entre la stimulation du NMDAR et la génération de la CDB. Par exemple, le rôle de la TOP2β dans ce processus est encore débattu et d'autres études suggèreraient plutôt un rôle de Spo11, une endonucléase impliquée dans les mécanismes de la méiose (Suberbielle *et al.*, 2013). En effet, les niveaux de Spo11 se retrouvent augmentés dans des régions de l'hippocampe suite à l'exploration d'un nouvel environnement par les souris.

3.2.3. Les cassures double-brin neuronales en conditions pathologiques

L'émergence des CDB comme mécanisme épigénétique étant très récente, peu de recherches se sont intéressées à la perturbation de ce mécanisme dans la pathogenèse de maladies neurologiques. Cependant quelques données ont déjà mis en évidence la perturbation de ce mécanisme dans la maladie d'Alzheimer (Suberbielle *et al.*, 2013; Shanbhag *et al.*, 2019; Thadathil *et al.*, 2021).

Les CDB ont été étudiées dans des neurones issus de tissus cérébraux appartenant à des modèles de souris ou de patients décédés, de la maladie d'Alzheimer. Dans les deux cas, il est retrouvé une augmentation du nombre de neurones ayant des CDB dans l'hippocampe, par rapport à un hippocampe « sain ». De plus, dans les modèles de souris, le nombre de CDB induites par l'exploration est augmenté et leur réparation est peu efficace même plus de 24 h après leur apparition (Suberbielle *et al.*, 2013).

Une des causes de la maladie d'Alzheimer est l'agrégation du peptide Aβ qui engendre diverses perturbations conduisant à des troubles de la mémoire et des fonctions exécutives, associés à une neurodégénérescence. En culture de neurones, le traitement par des oligomères d'Aβ suffit à induire une augmentation des CDB. Parce que les oligomères d'Aβ déclenchent une activation excessive des eNMDAR, cette accumulation de CDB a été supposée comme découlant de l'activation de ces récepteurs (Figure 13A). Ainsi, en bloquant spécifiquement les eNMDAR, les CDB induites par les oligomères d'Aβ sont stoppées (Suberbielle *et al.*, 2013). Chez les souris modèles et les patients décédés de la maladie d'Alzheimer, il a été observé une diminution des niveaux protéiques du facteur de réparation BRCA1, pouvant expliquer cette accumulation de CDB. La stimulation des eNMDAR par l'Aβ a été impliquée dans cette

diminution car cette activation déclenche la dégradation du facteur BRCA1 par le protéasome (Suberbielle *et al.*, 2015).

Finalement, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il y a un double impact de l'Aβ sur les niveaux de CDB dans les neurones. D'un côté l'Aβ peut simuler une stimulation excitotoxique *via* les eNMDAR et augmenter directement les niveaux de CDB. D'un autre côté, l'activation de ces récepteurs provoque également la dégradation d'un des facteurs de réparation majeur de ces CDB induite par la stimulation (Figure 13B).

De plus, il a également été montré que les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentaient une réduction des niveaux de DNA-PK et de Ku80, deux facteurs de réparation de la voie NHEJ (Kanungo, 2016). Ces déficits en facteurs de réparation expliquent également en partie la perturbation de la réparation des CDB.

Ainsi, l'accumulation de cassures et le défaut de réparation des CDB, par diminution des niveaux de facteurs de réparation, dans la maladie d'Alzheimer, sont une des causes des troubles observés dans cette maladie.

Depuis une dizaine d'années, un domaine d'étude émerge sur le rôle des CDB dans les maladies neurologiques et neurodégénératives. Aussi, la recherche des causes de la perturbation de cet équilibre devient donc un enjeu majeur dans l'étude de la pathogenèse de ces maladies (Figure 13B). Tout reste encore à étudier dans la caractérisation des mécanismes qui interviennent dans ce processus. En effet, les mécanismes et intermédiaires de l'induction des CDB et de leur réparation efficace, en conditions physiologiques, sont encore très peu connus. Ainsi, l'étude de la perturbation de ces mécanismes en conditions pathologiques contrôlées, nous permet de les aborder pour mieux les comprendre.

Mon travail de thèse s'est donc intéressé à étudier l'impact de deux conditions pathologiques sur cet équilibre : une infection virale et l'inflammation. Dans un premier temps, je me suis intéressé à étudier l'impact d'un virus neurotrope persistant : le Bornavirus. Dans le chapitre suivant, je vous présenterai en quoi ce virus est un modèle de choix pour étudier la perturbation des CDB neuronales. Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'impact de la neuroinflammation chronique et notamment le rôle des cytokines pro-inflammatoires sur les CDB ; afin de déterminer par quel(s) mécanisme(s) ces cytokines pourraient induire les symptômes neurologiques observés dans ces conditions *via* la perturbation de l'équilibre CDB/réparation.

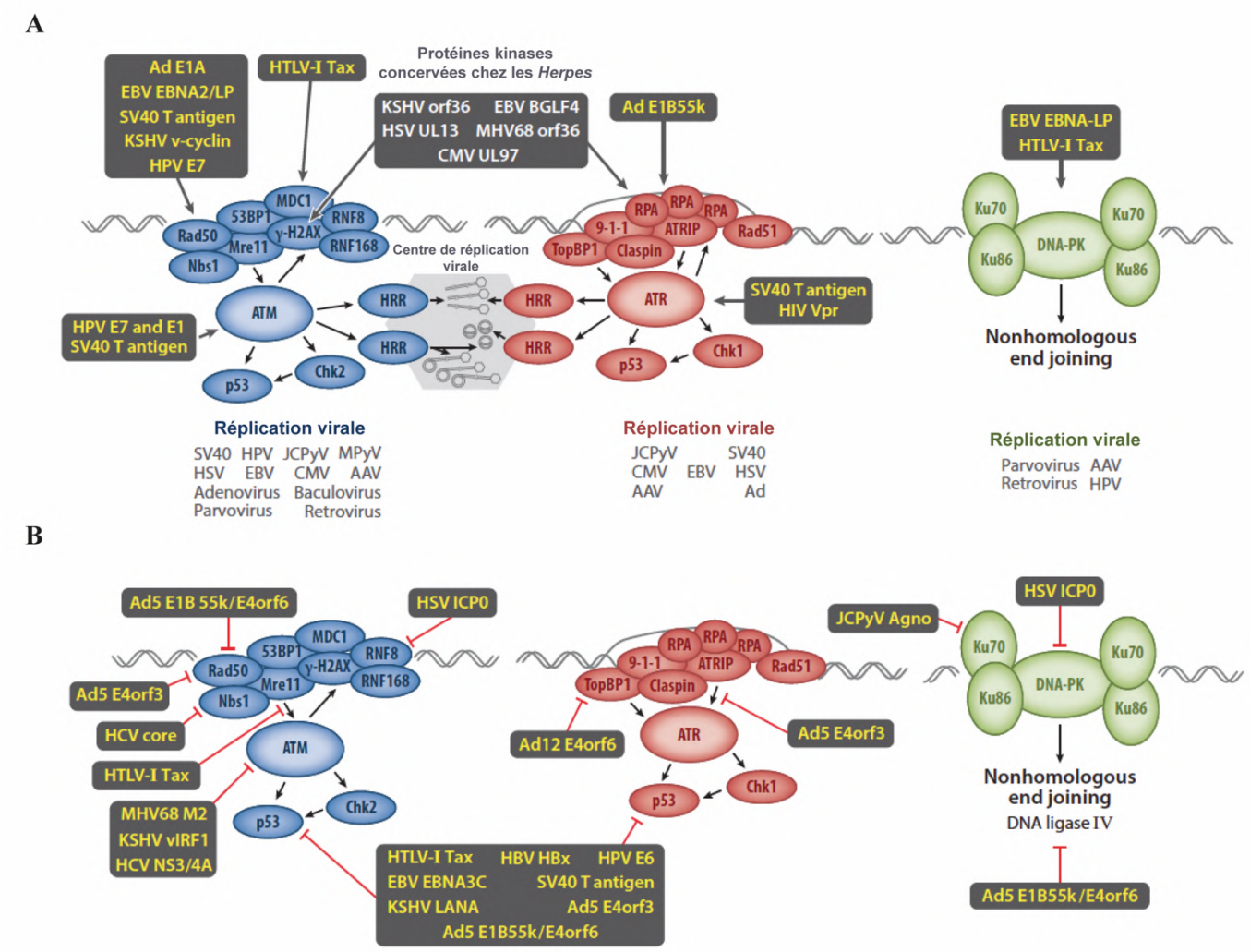


Figure 14 : Impact des virus sur la réponse aux cassures double-brin de l'ADN.
(A) Activation de la DDR par la réplication et les protéines virales. Le schéma représente les différentes cibles activées par les protéines virales. **(B)** Suppression de la DDR par la réplication et les protéines virales. Le schéma représente les différentes cibles inhibées par les protéines virales. AAV : *Adeno associated virus ;* Ad = *Adenovirus*; CMV = *Cytomegalovirus ;* EBV = *Epstein–Barr virus*; HBV= *Hepatitis B virus*; HCV, *Hepatitis C virus; HPV = Human papillomavirus*; HTLV-I = *Human T-lymphotropic virus type I*; JCPyV = *JC polyomavirus*; KSHV = *Kaposi sarcoma–associated herpesvirus*; MHV68 = *Murine gammaherpesvirus 68*; SV40 = *Simian virus 40.* D'après Luftig, 2014.

III. LE BORNAVIRUS : UN MODELE UNIQUE POUR L'ETUDE DES CASSURES DOUBLE-BRIN NEURONALES

En tant que parasites obligatoires, les virus doivent détourner la machinerie moléculaire de la cellule hôte afin de permettre leur cycle de réplication. Notamment, la réponse aux CDB représente une voie de signalisation cellulaire décisive pour les virus pour infecter, persister et se propager (Turnell & Grand, 2012; Luftig, 2014**).** En effet, il est utile pour les virus de contrôler le cycle cellulaire pour permettre d'avoir les conditions et les facteurs réunis dans un temps précis afin de favoriser la réplication virale. Or, les CDB dans les cellules mitotiques permettent le contrôle des *checkpoints* dans la progression du cycle cellulaire. Ainsi, détourner les facteurs intervenant dans la réparation de l'ADN apparait comme un processus pertinent pour détourner la machinerie de réparation à son compte. Intuitivement, ces mécanismes profitent donc aux virus à ADN, dont la majorité se réplique dans le noyau et trouve dans la réponse aux CDB une « boîte à outils » de facteurs pour permettre leur réplication (Weitzman & Fradet-Turcotte, 2018). De ce fait, ils peuvent à la fois activer la DDR afin de profiter des facteurs cellulaires pour leur réplication, mais également bloquer la DDR afin d'éviter l'activation de *checkpoints* pro-apoptotiques dépendants de p53 (Figure 14). De plus, ces virus génèrent, durant leur réplication, des CDB dans leur génome qui seront détectées et réparées par les facteurs cellulaires (Luftig, 2014). De plus, le détournement des facteurs de réparation conduit à des défauts dans la réparation des CDB de l'ADN cellulaire conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt profite ainsi aux virus qui peuvent utiliser l'ADN polymérase cellulaire et les facteurs de réplication de l'ADN cellulaire plus longtemps. Enfin, certaines protéines virales ont la capacité d'induire directement des CDB dans l'ADN cellulaire pour provoquer le recrutement des facteurs de réparation et l'arrêt du cycle cellulaire (Weitzman & Fradet-Turcotte, 2018). Par ailleurs, certaines données proposent maintenant que les virus à ARN, qui se répliquent majoritairement dans le cytoplasme, peuvent aussi tirer profit de la machinerie de réparation des dommages à l'ADN, par l'intermédiaire d'interaction de facteurs viraux avec des protéines de la DDR (Ryan *et al.*, 2016). Tout comme les rétrovirus qui manipulent les CDB pour permettre leur intégration dans l'ADN de la cellule infectée.

Jusqu'à présent, le rôle des CDB dans l'infection virale n'a été seulement étudié qu'en dehors du SNC et en utilisant des cellules mitotiques, dans lesquelles les CDB sont ultimement liées à la mort de la cellule ou au développement de tumeur (Turnell & Grand, 2012). L'étude de l'impact d'une infection virale sur la réponse aux CDB dans des neurones post-mitotiques

peut permettre de mettre en évidence l'altération de mécanismes qui seraient la cause de dysfonctions neuronales. En effet, comme vu dans le chapitre précédent, les CDB jouent un rôle crucial dans les neurones, comme facteurs épigénétiques dans les fonctions neuronales physiologiques et sont impliquées dans les mécanismes de plasticité neuronale. Ce rôle physiologique des CDB neuronales ayant été mis en évidence très récemment, très peu d'études se sont intéressées à l'impact d'une infection virale sur les fonctions neuronales en lien avec une perturbation de la réponse aux CDB. Pour les virus à ARN, le seul exemple connu est le virus Zika (ZIKV) qui peut engendrer des CDB dans le SNC. Cependant, il cible plutôt les cellules souches neurales mitotiques en arrêtant le cycle de mitose pour détourner la machinerie cellulaire pour sa propre réplication (Hammack *et al.*, 2019). Mais l'infection des cellules souches neurales par ZIKV conduit finalement à l'apoptose des cellules infectées. L'*Herpes simplex virus-1* (HSV-1) par exemple, qui est un virus à ADN, utilise les CDB endogènes pour maintenir sa latence et l'induction aiguë de CDB permet la réactivation et la reprise de la réplication du virus (Hu *et al.*, 2019). Mais le cycle lytique de HSV-1 se déroule majoritairement dans les cellules épithéliales et peu de protéines virales sont produites dans les neurones au cours de la latence.

Au laboratoire, nous travaillons sur le *Borna disease virus 1* (BoDV-1), un virus neurotrope à ARN qui se réplique exclusivement dans le noyau. Ce virus est capable de persister dans le cerveau tout au long de la vie de l'hôte, sans induire la mort de la cellule hôte et peut induire des troubles du comportement. Le BoDV-1 apparait donc comme un modèle de choix pour étudier l'impact d'une infection virale sur les CDB dans les neurones et l'impact sur la plasticité neuronale.

1. PRESENTATION GENERALE

1.1. *Histoire et taxonomie*

Dès le XVIIIème siècle, des traités vétérinaires font mention d'une maladie neurologique fatale, de type méningo-encéphalite foudroyante, qui affecte de façon sporadique des chevaux du Sud-Est de l'Allemagne. Au départ nommé *Kopfkrankheit* ou « maladie de la tête brûlante » (Von Sind, 1781), la maladie de Borna a gagné sa notoriété et son nom actuel lorsqu'en 1895 elle immobilisa un régiment de cavalerie de l'armée prussienne, basé dans la ville de Borna en Saxe (Dürrwald & Ludwig, 1997). L'étiologie virale ne fut finalement découverte qu'après des expériences d'ultrafiltration de cerveaux infectés et de réinfection par l'équipe de William

Genre	Espèce	Virus (abréviation)
Carbovirus	*Queenslans carbovirus*	*Jungle carpet python virus (JCPV)*
	Southwest carbovirus	*Southwest carpet python virus (SWCPV)*
Culterivirus	*Sharpbelly carbovirus*	*Wŭhàn sharpbelly bornavirus (WhSBV)*
Orthobornavirus	*Elapid 1 orthobornavirus*	*Loveridge's garter snake virus 1 (LGSV-1)*
	Mammalian 1 orthobornavirus	*Borna disease virus 1 (BoDV-1)*
		Borna disease virus 2 (BoDV-2)
	Mammalian 2 orthobornavirus	*Variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1)*
	Passeriform 1 orthobornavirus	*Canary bornavirus 1 (CnBV-1)*
		Canary bornavirus 2 (CnBV-2)
		Canary bornavirus 3 (CnBV-3)
	Passeriform 2 orthobornavirus	*Estrildid finch bornavirus 1 (EsBV-1)*
	Psittaciform 1 orthobornavirus	*Parrot bornavirus 1 (PaBV-1)*
		Parrot bornavirus 2 (PaBV-2)
		Parrot bornavirus 3 (PaBV-3)
		Parrot bornavirus 4 (PaBV-4)
		Parrot bornavirus 7 (PaBV-7)
	Psittaciform 2 orthobornavirus	*Parrot bornavirus 5 (PaBV-5)*
	Waterbird 1 orthobornavirus	*Aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)*
		Aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)

Figure 15 : Taxonomie de la famille des *Bornaviridae*.
Classification des différentes espèces de Bornavirus connues à ce jour. L'espèce de référence est soulignée. Toutes les descriptions des signes cliniques et du cycle de réplication faites dans l'introduction se basent sur l'espèce de référence. Le virus de référence, BoDV-1, est celui étudié dans le cadre de ma thèse. Adapté de Amarasinghe, 2019.

Zwick de 1924 à 1928 (Zwick *et al.*, 1927). Ce n'est qu'en 1977, que le virus de la maladie de Borna est caractérisé comme un virus enveloppé à ARN (Ludwig *et al.*, 1977).

Finalement, la grande partie de la caractérisation moléculaire du virus de la maladie de Borna se fera dans les années 1990, avec l'amélioration des techniques de biologie moléculaire. Les premières séquences sont découvertes par les laboratoires de Lipkin et de de la Torre aux Etats-Unis (Cubitt *et al.*, 1994; Lipkin *et al.*, 1990; Briese *et al.*, 1994) ; le virus se fait désormais appeler le virus de la maladie de Borna (BDV ; Borna Disease Virus). Par la suite, des caractéristiques particulières pour un virus à ARN sont mises en évidence comme la localisation nucléaire de la transcription ou la présence d'un épissage de l'ARN, conduisant en 1996, à la classification du BDV(Pringle, 1996) comme premier membre de la nouvelle famille des *Bornaviridae* dans l'ordre des *Mononegavirales* (Cubitt & de la Torre, 1994; Briese *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1994; Schneemann *et al.*, 1994; de la Torre, 1994).

Ces caractéristiques moléculaires le démarquent de ses « cousins » du même ordre à savoir *Rhabdoviridae* (virus de la rage et de la stomatite vésiculaire), *Paramixoviridae* (virus de la rougeole) et *Filoviridae* (virus Ebola et Marburg). Le BDV, infectant les mammifères, fut pendant longtemps le seul membre de sa famille. Aujourd'hui, se sont près de onze espèces qui ont été identifiés dans la famille des *Bornaviridae*, capables d'infecter une grande diversité d'animaux. Certaines espèces ont été décrites comme infectant les Psittacidés (perroquets, perruches…) (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008), les reptiles (Stenglein *et al.*, 2014) ou encore les poissons (Shi *et al.*, 2018).

Désormais, le patronyme BDV ne suffit plus pour répertorier les différentes espèces de *Bornavirus* qui infectent les mammifères. Entre autre, le genre *Orthobornavirus* regroupant les virus ancestraux (dont BDV) est créée. Il contient l'espèce *Mammalian 1 orthobornavirus* (BoDV) considérée comme l'espèce de référence (Figure 15) (Amarasinghe *et al.*, 2019). Parmi cette espèce se trouve le virus *Borna disease virus 1* (BoDV-1) qui m'aura servi de modèle d'étude pour mes travaux de thèse et qui servira de référence pour toute la suite de ce chapitre.

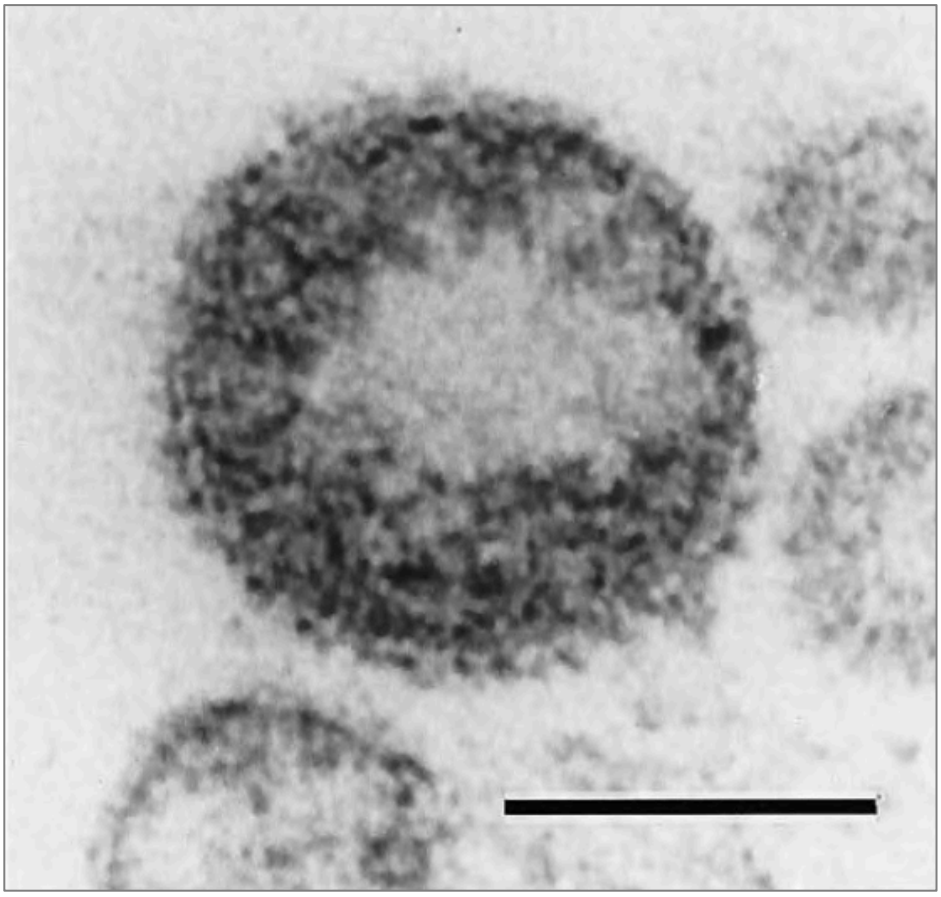


Figure 16 : Image par microscopie électronique d'une particule virale de BoDV.
Barre d'échelle : 100 nm. D'après Kohno, 1999.

1.2. *Du génome à la structure de la particule*

Le BoDV est un virus sphérique et enveloppé de 70 à 130 nm qui présente à sa surface des « épines » de 7 nm correspondant aux glycoprotéines d'enveloppe (Figure 16) (Zimmermann *et al.*, 1994; Kohno *et al.*, 1999). La particule virale contient un génome de type ARN simple brin, non segmenté, de polarité négative (qui doit être transcrit par la polymérase virale avant d'être traduit en protéines), de 8,9 kb. Le BoDV présente le génome le plus compact de tous les autres virus du même ordre. L'évolution du virus a donc sélectionné différentes stratégies pour lui permettre d'exprimer ses six protéines : ARN polycistronique, épissage alternatif et chevauchement de cadres de lecture (Tomonaga *et al.*, 2002). Bien que le nombre précis de transcrits soit encore inconnu, il est admis qu'il existe au moins quatre transcrits principaux (Figure 17) (Schneider *et al.*, 1994; Lipkin *et al.*, 2011; Kojima *et al.*, 2018) qui permettent de coder, en partant de l'extrémité 3', les protéines suivantes :

-La nucléoprotéine p38/p40 (N),

-La phosphoprotéine p24/p16 (P),

-La protéine p10 (X) traduite à partir d'un cadre de lecture chevauchant celui de la P,

-La protéine de matrice p17 (M),

-La glycoprotéine d'enveloppe (G), produite sous sa forme gp84/94 puis clivée lors du cycle viral en formes gp51 et gp43,

-L'ARN polymérase ARN dépendante p190 (L).

Chacune de ces protéines a une ou plusieurs fonctions bien définies dans le cycle de réplication du BoDV.

L'enveloppe de la particule virale est formée d'une bicouche lipidique dans laquelle est enchâssée la glycoprotéine sous sa forme gp84/94 et gp43. Sous l'enveloppe, la protéine M de matrice tapisse la face interne de la membrane. A l'intérieur du virion, il est retrouvé le génome viral de polarité négative sur lequel est fixée, à la façon d'un collier de perles, la nucléoprotéine (N) qui forme une nucléocapside pour protéger l'ARN génomique viral de sa dégradation par des RNases cellulaires. Ce complexe est également associée à la phosphoprotéine (P) et à la polymérase virale (L) (Hirai *et al.*, 2016) (Figure 18). L'ensemble forme un complexe appelé ribonucléoparticule (RNP).

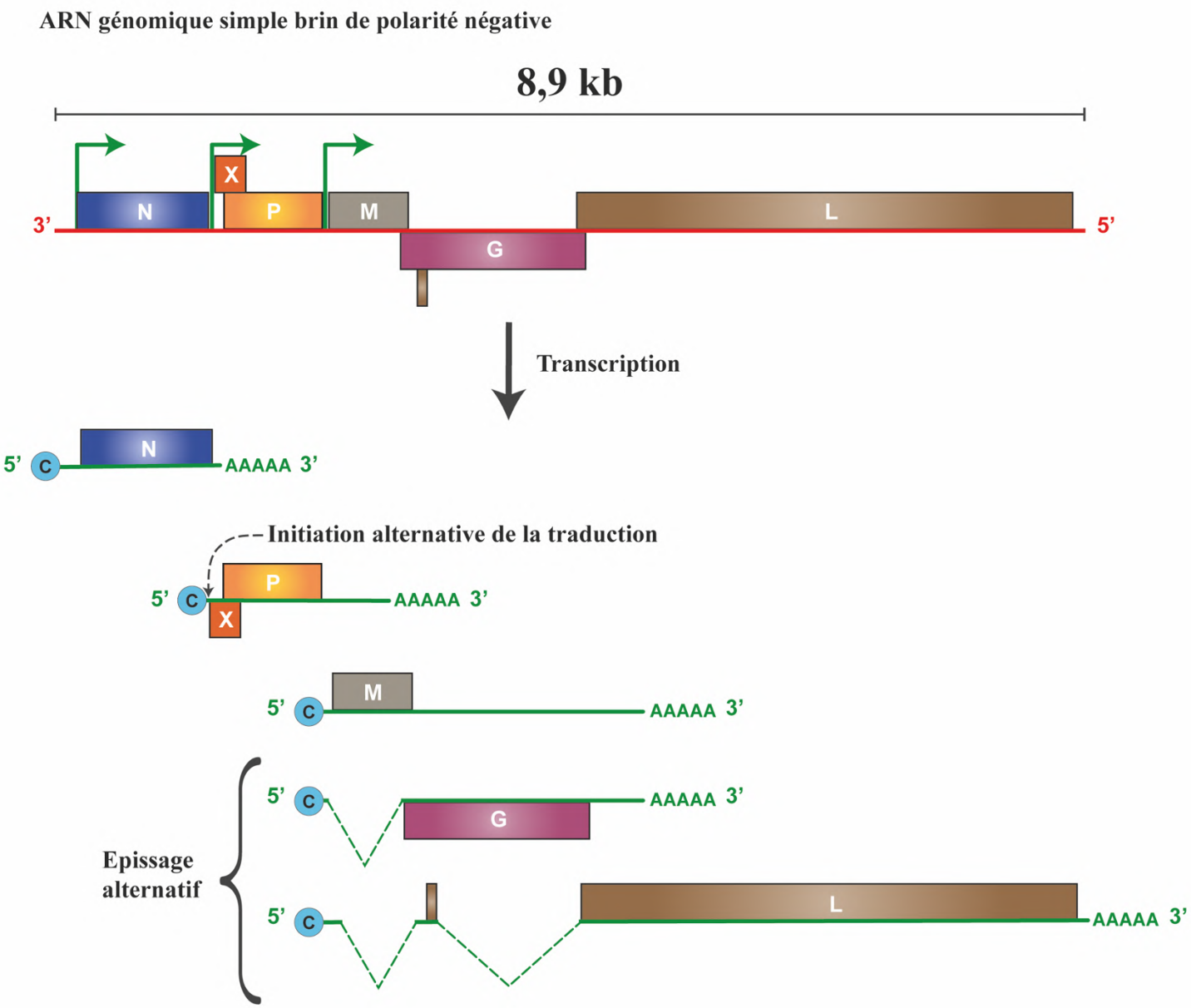


Figure 17 : Organisation du génome du BoDV et schéma simplifié des différents transcrits viraux synthétisés au cours du cycle viral.
En haut, le génome viral complet avec l'emplacement des différents gènes, ainsi que les sites d'initiation de la transcription (flèches vertes). Après transcription, les quatre principaux ARNm subgénomiques viraux et les différents évènements d'épissage. Sur l'ARNm codant les protéines X et la P, il y a deux sites d'initiation de la traduction qui permettent la production de deux protéines différentes sur le même transcrit. La fixation du ribosome se fait de façon aléatoire sur chaque site et dans des proportions équivalentes pour chaque protéine. Adapté de ViralZone et Lipkin, 2011.

2. CYCLE DE REPLICATION

2.1. *Tropisme*

En conditions naturelles d'infection, le BoDV infecte préférentiellement les neurones du SNC et plus particulièrement les neurones du système limbique (hippocampe, amygdale, hypothalamus…). Aussi, *in vitro* comme *in vivo,* l'infection à BoDV n'induit aucun effet cytopathique et persiste dans la cellule hôte sans induire directement de mort neuronale (Herzog & Rott, 1980). Même si le BoDV reste préférentiellement neurotrope, une fois établie, l'infection à BoDV finit par envahir tout le SNC, périphérique et autonome, en infectant les astrocytes, les cellules de Schwann et les cellules épendymaires du SNC, puis tous les nerfs menant aux organes.

2.2. *Adsorption et entrée du virus*

La glycoprotéine gp84/94 à la surface de l'enveloppe du virus permet l'attachement de la particule au récepteur de la cellule cible (Figure 19, étape 1)(Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998). Ce récepteur reste à ce jour inconnu mais, à l'évidence, doit être une protéine membranaire ubiquitaire puisque, *in vitro,* le BoDV présente un large tropisme pour plusieurs types cellulaire. Le BoDV reste cependant préférentiellement neurotrope et infecte les neurones de l'hippocampe avant d'envahir le cerveau et d'infecter les cellules gliales.

La particule virale est ensuite endocytée par un mécanisme dépendant de la clathrine (Figure 19, étape 2). Une fois dans l'endosome, la forme clivée de la gp84/94, gp43, va s'insérer dans la membrane de l'endosome et provoquer la fusion de la membrane virale avec l'endosome (Figure 19, étape 3) (Clemente & de la Torre, 2009; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998).

La RNP est donc libérée directement dans le cytoplasme. Elle est ensuite adressée au noyau, *via* des mécanismes qui sont encore inconnus, où elle pourra initier les étapes de réplication virale (Figure 19, étape 4).

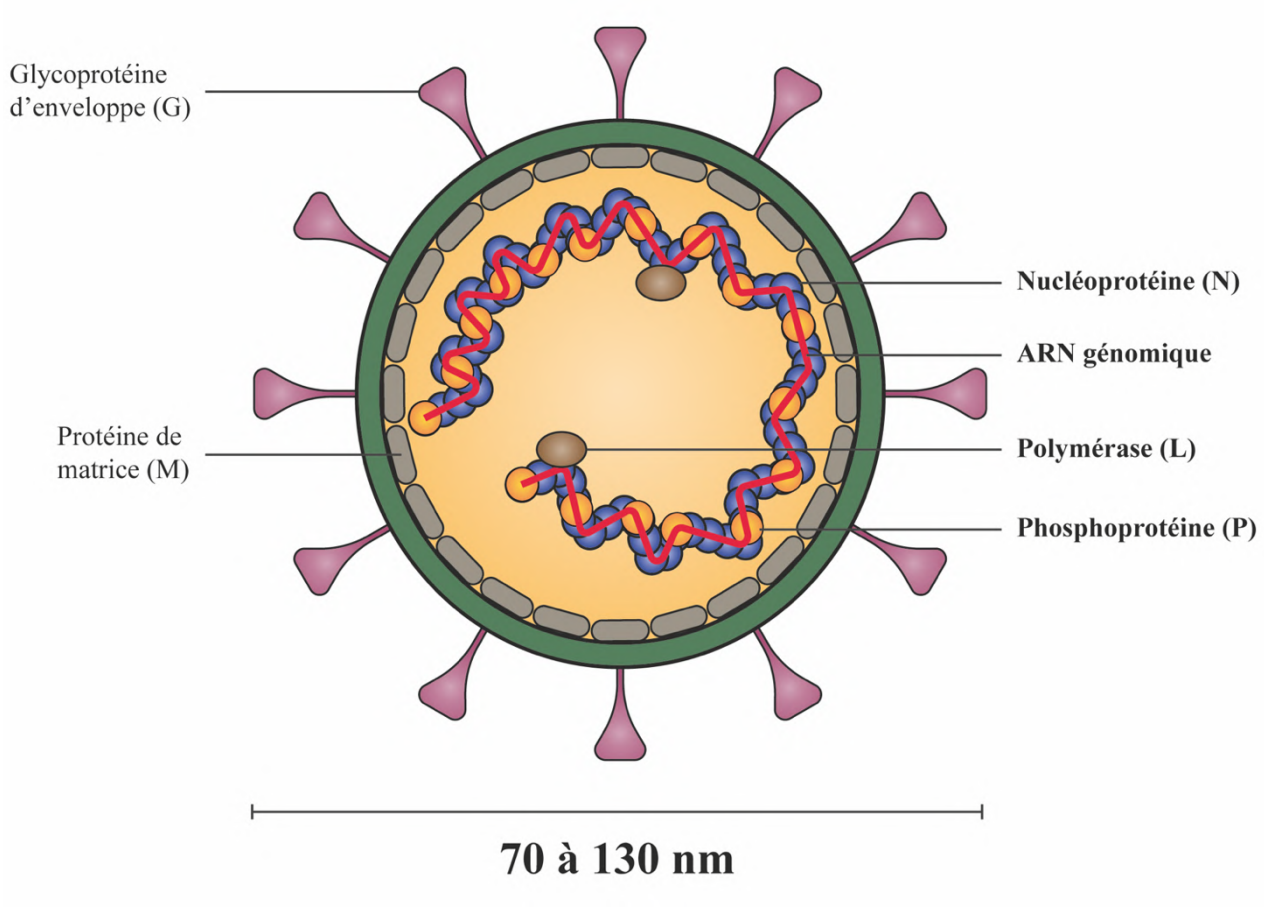


Figure 18 : Représentation schématique d'une particule du BoDV.
Les éléments en gras constituent la ribonucléoprotéine qui contient tous les éléments essentiels à l'initiation de la transcription une fois la cellule hôte infectée.

2.3. *Expression des protéines virales et réplication*

Une caractéristique, que le BoDV partage avec quelques autres virus à ARN d'autres familles comme les *Orthomyxoviridae* (virus de la grippe) ou *Nyamiviridae* (virus aviaire), est que l'intégralité de son cycle de réplication se déroule dans le noyau. En tant que virus à ARN de polarité négative, une des premières étapes de son cycle est une transcription qui va permettre de « fabriquer » de nouvelles protéines virales. La particule virale contient toutes les protéines nécessaires et suffisantes dont le virus a besoin pour initier sa réplication (la N, la P et la L) (Perez *et al.*, 2003; Perez & de la Torre, 2005). Il va alors former des usines de réplication ou *viral Speckle of transcripts* (vSPOT) en interaction avec la chromatine (Matsumoto *et al.*, 2012). Nous discuterons plus loin dans le chapitre des détails de cette structure importante pour la réplication virale (Figure 19, étape 5). Comme pour les autres virus à ARN de polarité négative, l'ARN génomique empaqueté par la nucléoprotéine N constitue la ribonucléocapside qui sert de support pour le complexe polymérase de la protéine L avec son cofacteur la phosphoprotéine P (Mayer *et al.*, 2005). La protéine X, même si elle ne fait pas partie du complexe RNP à son entrée dans le noyau, joue un rôle dans la formation et l'activité du complexe polymérase en inhibant l'activité enzymatique de la polymérase L (Watanabe *et al.*, 2000; Poenisch *et al.*, 2004; Schwardt *et al.*, 2005). L'ensemble de ces acteurs participent à l'expression et le contrôle de l'expression des gènes viraux et à la réplication virale.

2.3.1. Transcription

L'ARN génomique sert tout d'abord de matrice à l'ARN polymérase ARN dépendante virale (L) pour la transcription des ARN messagers (ARNm) subgénomiques. Cette transcription démarre en 3' du génome viral et dispose de trois sites d'initiation et quatre sites de terminaison (Schneemann *et al.*, 1994). Elle permet donc la synthèse de quatre transcrits primaires essentiels, épissés ou non, qui, de façon similaire aux autres *Mononegavirales*, sont produits de façon séquentielle et « polaire » permettant aux gènes du côté 3' du génome viral d'être plus exprimés que les gènes du côté 5' (Figure 17, Figure 19, étape 6). Les ARNm viraux sont ensuite 5'-coiffé et 3'-polyadénylés puis exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines (Figure 19, étape 7).

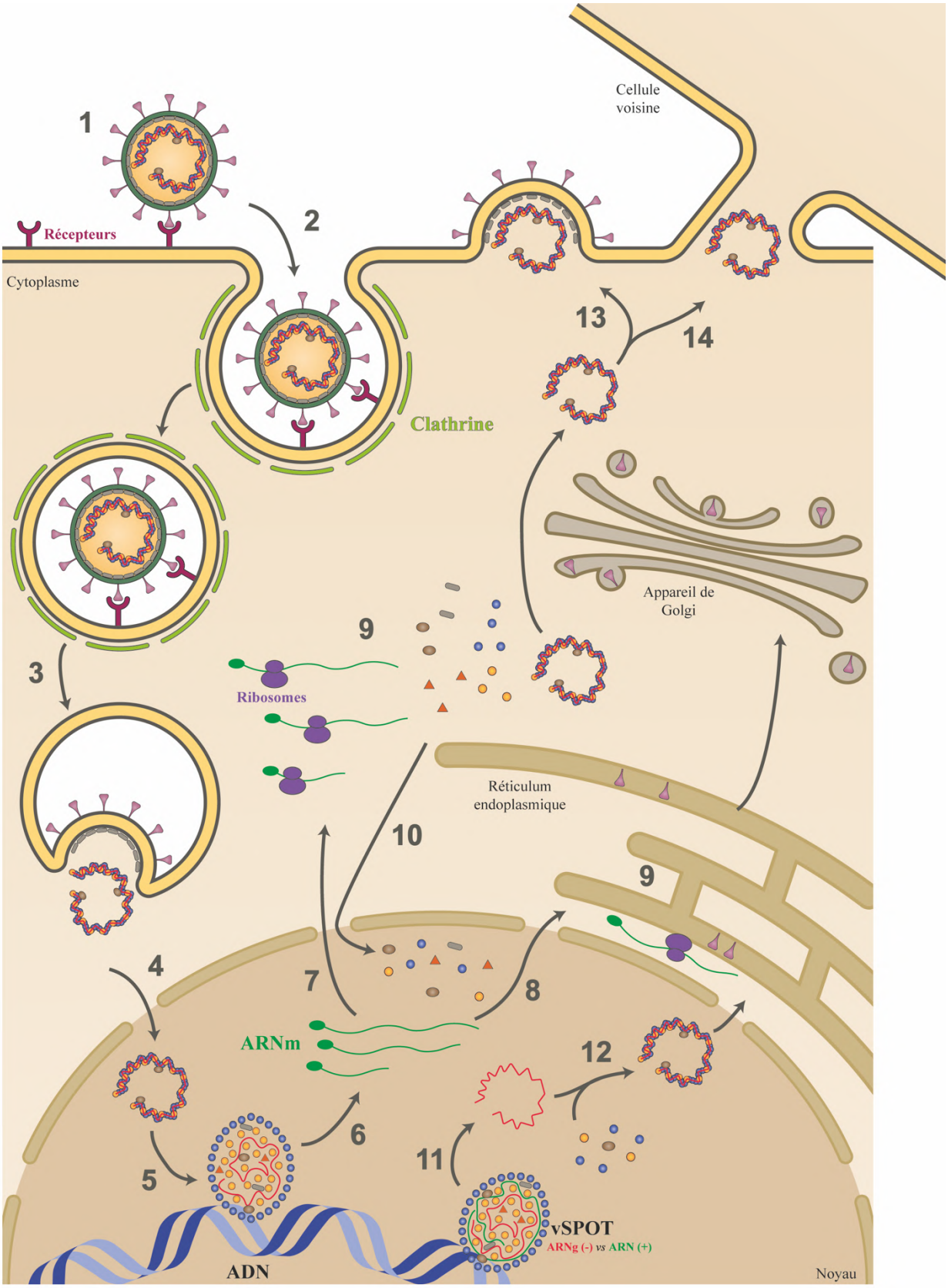


Figure 19 : Schéma du cycle de réplication du BoDV.
(Légende pages suivantes)

2.3.2. Traduction

Les protéines N, P, X, L et M sont traduites dans le cytosol et la glycoprotéine va être transloquée au niveau du réticulum endoplasmique puis amenée dans l'appareil de Golgi pour sa maturation (glycosylations, etc…) (Figure 19, étape 8-9). Les protéines N, P, L et X disposent de séquences d'adressage au noyau (NLS) et d'export du noyau (NES) qui leur permettent de pouvoir retourner dans le noyau pour remplir leurs fonctions dans la réplication du génome viral et de faire la navette avec le cytoplasme. Ces protéines sont aussi capables d'interagir entre elles (Figure 20). D'une part, cela leur permet de remplir leur rôle de cofacteur comme la phosphoprotéine P pour la polymérase L. D'autre part, certains sites d'interaction chevauchent des NES ou NLS. Les interactions entres protéines virales favorisent donc leur propre relocalisation, par exemple la phosphoprotéine P peut se fixer sur le NES de la nucléoprotéine N pour favoriser son retour dans le noyau (Figure 19, étape 10) (Kobayashi *et al.*, 2001; Honda & Tomonaga, 2013). Ces interactions permettent aux protéines et aux RNP d'autoréguler leur localisation.

2.3.3. Réplication

En parallèle de la production de protéines, l'ARN génomique sert également de matrice pour la réplication *via* la production d'antigénome de polarité positive. Cet ARN est de nouveau pris en charge dans le vSPOT par la polymérase L, pour produire de nombreuses copies du génome viral, cette fois-ci de polarité négative. Même si le lieu de l'assemblage des RNP n'est pas vraiment connu, il est suggéré que celles-ci soient formées dans le noyau (Figure 19, étape 11-12) (Honda & Tomonaga, 2013).

2.4. *Assemblage et dissémination*

L'ARN génomique viral nouvellement produit, recouvert de sa nucléocapside, est exporté vers le cytoplasme grâce aux séquences NES portées par les protéines N et P de la RNP. Entre autres, la présence d'une isoforme raccourcie de la nucléoprotéine N qui ne dispose pas de NLS (N p38), pourrait expliquer ces mouvements (Kobayashi *et al.*, 2001; Honda & Tomonaga, 2013). La protéine de matrice M semblerait également s'assembler avec la RNP mais pas la protéine X (Chase *et al.*, 2007).

La légende des éléments du virus est conservée sur la base de la Figure 16. La protéine X est représentée par des triangles orange.

Même si toutes les étapes du cycle viral du BoDV ne sont pas encore bien connues, voici les principales étapes qui le compose :

1) Fixation du virus sur son récepteur (inconnu) *via* la glycoprotéine d'enveloppe G.
2) Endocytose de la particule virale par une mécanisme clathrine dépendant.
3) Fusion de la particule virale avec la membrane de l'endosome et libération de la RNP dans le cytoplasme.
4) Import de la RNP dans le noyau.
5) Mise place du vSPOT, l'usine de réplication virale.
6) Transcription, dans les vSPOT, de l'ARN génomique de polarité négative en ARNm qui sont épissés, coiffés et poly-adénylés.
7) Export des ARNm dans le cytoplasme.
8) Export de l'ARNm de la glycoprotéine d'enveloppe vers le réticulum endoplasmique.
9) Traduction des protéines virales.
10) Import des protéines virales dans le noyau pour qu'elles remplissent leurs fonctions dans le cycle viral.
11) Réplication de l'ARN viral dans les vSPOT. L'ARNg de polarité négative (ARNg (-))est transcrit en ARN de polarité positive (ARN (+)) qui sert de support à la fabrication de copies d'ARNg viral.
12) Assemblage des RNP dans le noyau.
13) Les virus bourgeonnent à la surface des cellules infectées.
14) Les virus vont infecter les cellules voisines par contacts « de proche en proche ».

Les étapes 13 et 14 ne sont pas encore bien décrites.

Les dernières étapes de la réplication du cycle du BoDV ne sont malheureusement que très peu décrites et semblent varier en fonction du type cellulaire infecté, notamment les modalités de dissémination du virus. Durant une infection par le BoDV de lignées cellulaires permissives, pas à peu de particules virales sont retrouvées dans le surnageant (Carbone *et al.*, 1993). Aussi, une fois l'infection établie, les virus sont capables de se disséminer sans avoir besoin de la glycoprotéine, ni de l'activité furine (Clemente & de la Torre, 2007). Ceci suggère que la dissémination se ferait par contact de proche en proche d'une cellule infectée à une cellule cible *via* un transfert de la RNP non enveloppée. Néanmoins, il est clairement établi que le BoDV se dissémine selon un mécanisme dépendant d'une interaction avec la forme gp84/94 de la glycoprotéine G et un récepteur cellulaire (Bajramovic *et al.*, 2003). Ainsi, deux voies de dissémination semblent être privilégiées par le BoDV : une *via* un bourgeonnement pour recueillir la forme gp84/94 (Figure 19, étape 13) et une *via* des contacts intercellulaires avec un transfert direct de la RNP (Figure 19, étape 14).

2. LE VSPOT : UNE STRUCTURE CLE DANS LA REPLICATION DU BODV

2.1. *Interaction avec la chromatine*

En 1911, Joest-Degen met en évidence la présence de corps d'inclusion intranucléaires dans les neurones comme étant pathognomonique de l'infection par le BoDV chez les chevaux. Plus tard, il est observé que ces structures sont des agrégats de protéines virales contenant du génome viral. Ces structures sphéroïdes intranucléaires en forme de « spot » sont alors nommés corps de Joest-Degen par son découvreur (Sasaki & Ludwig, 1993). Des structures similaires appelées corps de Négri ont été étudiées chez d'autres *Mononegavirales* comme le virus de la rage (RABV) ou les corps d'inclusion du virus Ebola (EBOV) (Lahaye *et al.*, 2009). De morphologie équivalente mais localisées dans le cytoplasme pour RABV et EBOV, ces structures laissent penser qu'elles sont le lieu de la réplication du virus et qu'elles constituent les usines de réplication virale. Dans le cadre d'une étude sur la dynamique intranucléaire du BoDV, pour comprendre son cycle de réplication, les structures ont été retrouvées en interaction avec la chromatine de cellules issues d'une lignée dérivée d'oligodendriome (OL). Il a été confirmé que ces structures contiennent à la fois les protéines virales nécessaires à la réplication du virus mais également le génome viral et les transcrits. De fait, ces structures de réplication virale sont finalement appelées vSPOT (*viral Speckle of Transcripts*) (Matsumoto *et al.*, 2012).

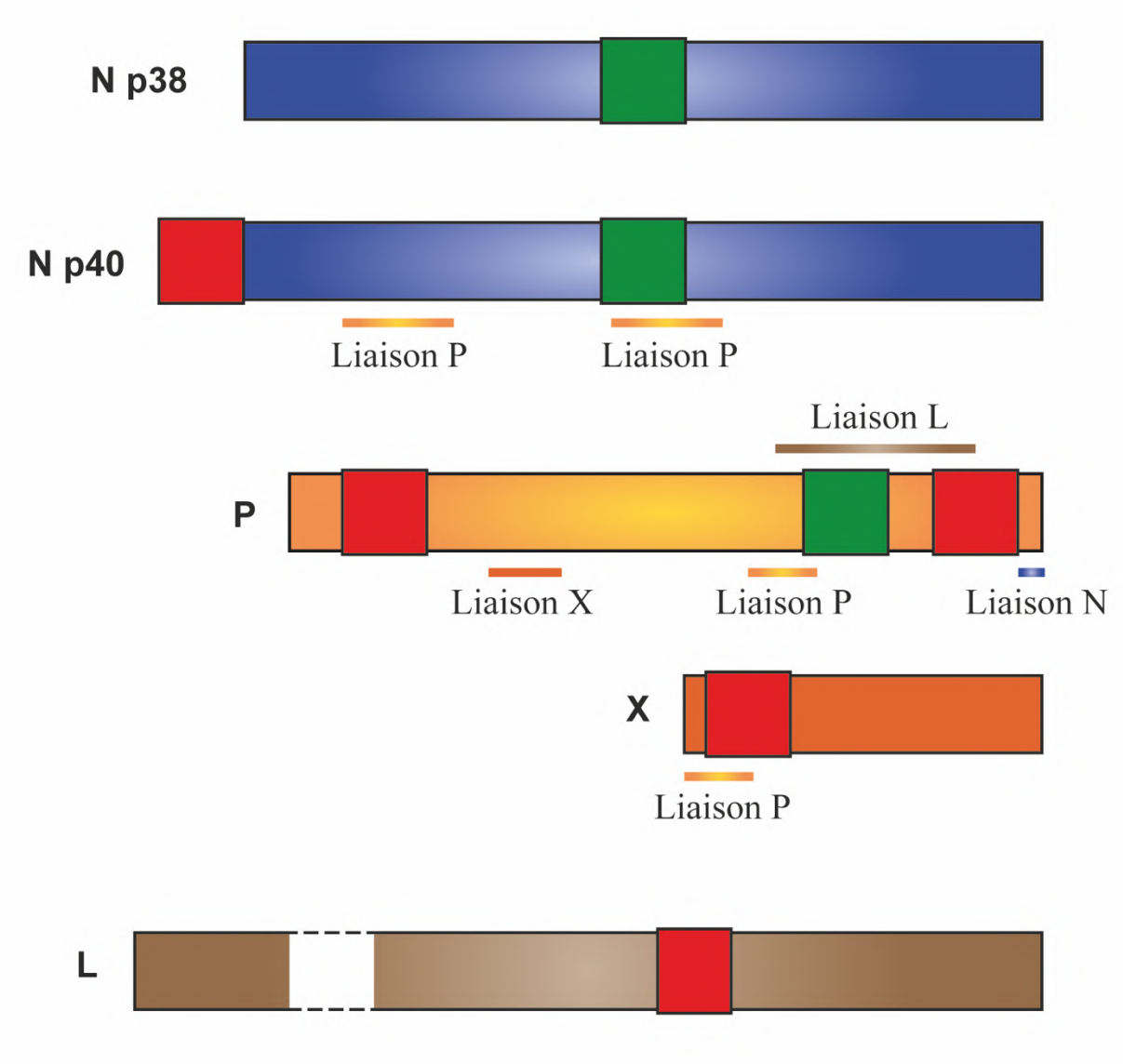


Figure 20 : Carte des interactions connues entre les protéines virales et signaux de transport nucléocytoplasmique.
En rouge les séquences NLS, en vert les séquences NES. La nucléoprotéine N est traduite sous deux formes, une forme complète N p40 avec un motif NLS en N-terminal et une forme plus courte N p38 qui ne dispose pas de la partie N-terminal contenant le NLS. Les deux isoformes ont les mêmes interactions avec la phosphoprotéine P. Adapté de Honda, 2013.

Lors de la mitose de cellules OL infectées, les vSPOT sont capables de suivre les chromosomes et de migrer avec eux, renforçant le fait que ces vSPOT sont en interaction très forte avec la chromatine. L'interaction avec la chromatine dépend de l'interaction des protéines virales avec des composants de la chromatine : par exemple, la nucléoprotéine N peut interagir avec l'histone H2B et dans une moindre mesure, l'histone H2A. Ces résultats suggèrent que les histones du cœur du nucléosome servent à l'ancrage des vSPOT sur la chromatine. De plus, la nucléoprotéine N peut aussi interagir avec PARP-1, une protéine de la machinerie de réparation des CDB, qui se trouve à proximité de la chromatine. Seulement, cette interaction ne semble avoir lieu qu'à l'extérieur des vSPOT. Aussi, la nucléoprotéine N présente une grande stabilité une fois incluse dans le vSPOT. Enfin, il est également connu que la phosphoprotéine P peut interagir avec la protéine HMGB1 (*High-mobility group box 1*) (Kamitani *et al.*, 2001). La protéine HMGB1 est une protéine mobile de l'architecture de l'ADN, capable de se lier à la chromatine en fonction de l'état d'acétylation des histones (Catez & Hock, 2010). Du fait de sa mobilité, la protéine HMGB1 est capable d'entrer et de sortir du vSPOT. La présence de la protéine HMGB1 n'est pas nécessaire à la formation des vSPOT mais est nécessaire comme intermédiaire dans l'interaction de la phosphoprotéine P avec la chromatine et est nécessaire à une réplication efficace du virus et à sa persistance. De la même manière, si l'interaction entre la phosphoprotéine P et la protéine HMGB1 est supprimée par modification du site d'interaction sur la protéine P alors la protéine HMGB1 ne transite plus par le vSPOT et la réplication virale est diminuée (Matsumoto *et al.*, 2012). La protéine HMGB1 participe donc à la stabilisation des vSPOT sur la chromatine permettant, par des mécanismes encore inconnus, la réplication efficace du virus et sa persistance.

2.2. *Une usine bien organisée*

Depuis 2016, d'autres découvertes ont été faites sur l'organisation des vSPOT. L'expression seule de la nucléoprotéine N ou de la phosphoprotéine P par transfection ou transduction ne suffit pas pour induire la mise en place d'un vSPOT, suggérant que la particule virale doit être au complet avec sa RNP pour pouvoir générer des vSPOT. Le vSPOT est une structure sphéroïde d'environ 0,7 µm en interaction avec la chromatine. Dans des cellules OL, on compte environ 4,6 vSPOT par cellule infectée (Hirai *et al.*, 2016). La présence d'ARN viral génomique et transcrit dans le vSPOT a été confirmée, indiquant que le vSPOT est bien le lieu de réplication et transcription du génome viral.

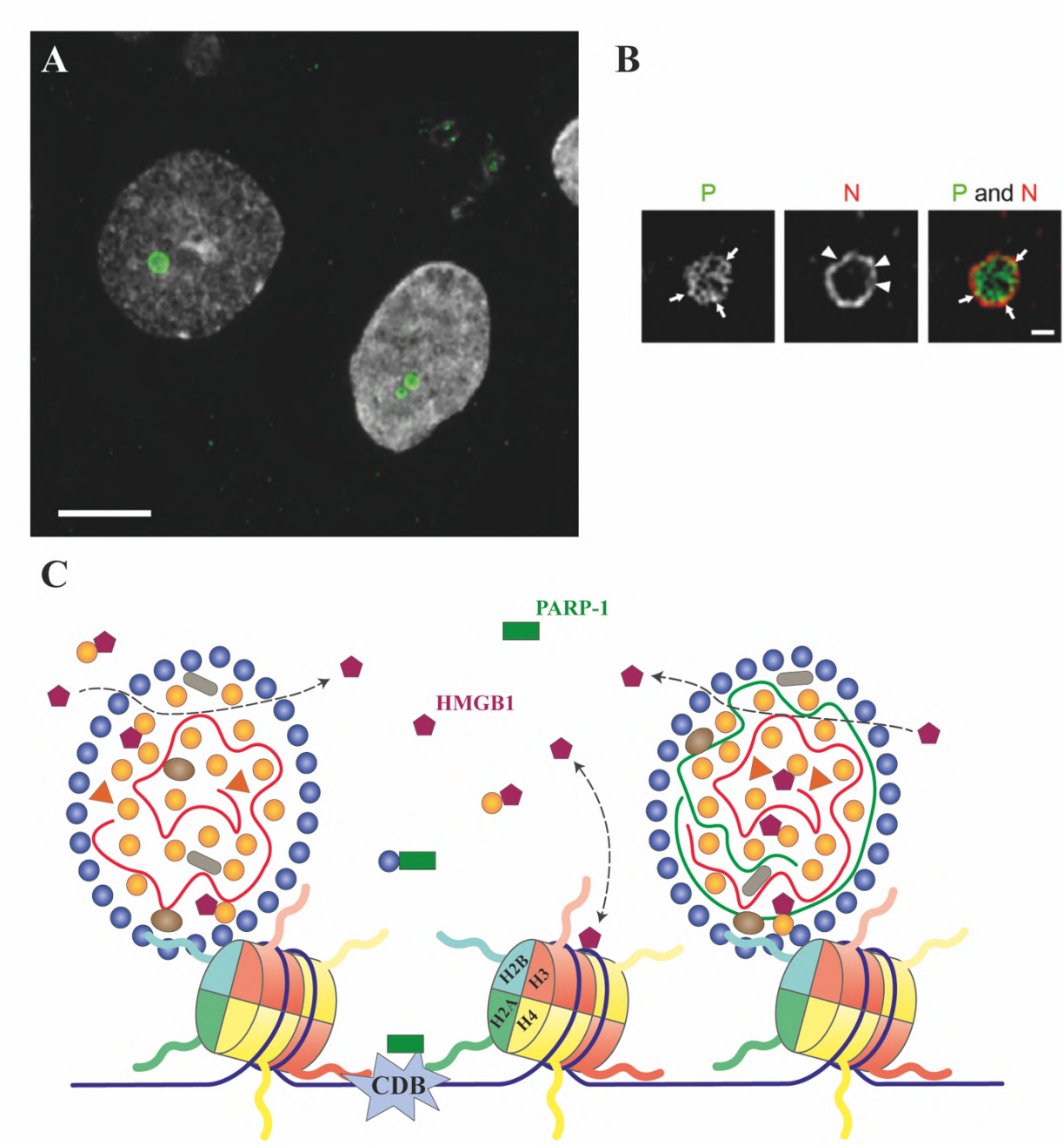


Figure 21 : Structure et organisation des vSPOT.
(A) Visualisation de vSPOT dans le noyau de neurones. Marquage de la nucléoprotéine N en vert en anneau caractéristique et noyau en gris (DAPI). Observation au microscope confocal Leica SP8 (63x) avec un zoom optique. Barre d'échelle : 10 µm. **(B)** Organisation des protéines majeures dans un vSPOT. Observation par microscopie confocale à super résolution (SIM : *Structured illumination microscopy*) à l'objectif 100x (Hirai, 2016). Flèches : colocalisation entre les protéines N et P, tête de flèche : pore autour du vSPOT. Barre d'échelle : 500 nm. **(C)** Schéma hypothétique de l'organisation des vSPOT en interaction avec la chromatine. La protéine N interagit avec l'histone H2B (en bleu ciel) et PARP-1. La protéine P interagit avec HMGB1, une protéine mobile qui se déplace de vSPOT en vSPOT et qui peut aussi interagir avec la chromatine pour remplir une partie de ses fonctions. ARNg viral en rouge et ARNm viral naissant en vert. D'après Matsumoto, 2012.

Le vSPOT est formé essentiellement des protéines N et P. Les nucléoprotéines N forment un bouclier, une coque, observable en microscopie confocale (3D) et qui entoure le vSPOT alors que sur un seul plan focal (2D), elle prend l'apparence d'un anneau (Figure 21A-B). Au centre, il y a la phosphoprotéine P et dans des quantités bien moins importantes, il est également retrouvé la protéine X ainsi que la protéine de matrice M (Hirai *et al.*, 2016). De l'imagerie à haute résolution a permis d'étudier l'organisation des protéines N et P dans le vSPOT. Autant la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P ont des profils de distribution reproductible d'un vSPOT à l'autre, autant la distribution des protéines X et M est très aléatoire d'un vSPOT à l'autre, d'un point de vue de la quantité mais aussi de la localisation. Les phosphoprotéines P s'organisent en un réseau filamenteux à l'intérieur du vSPOT. L'anneau de nucléoprotéines N en périphérie du vSPOT laisse apparaitre des petits trous, des pores d'une centaine de nm (Figure 21B, C). Par analogie avec des structures similaires d'autres virus, ces pores pourraient permettre de laisser entrer ou sortir de l'ARN viral (génomique ou transcrit), des protéines, des RNP complètes ou même des facteurs cellulaires comme la protéine HMGB1 (Matsumoto *et al.*, 2012; Hirai *et al.*, 2016).

En résumé, le BoDV est capable d'assembler, dans le noyau des cellules infectées, des usines de réplication virale ou vSPOT, en interaction avec la chromatine et les histones du cœur du nucléosome. Ces vSPOT sont des structures assez stables mais « poreuses » permettant à des facteurs viraux ou cellulaires de faire la navette entre l'intérieur du vSPOT et l'espace intranucléaire (Figure 21C).

3. EPIDEMIOLOGIE

L'infection naturelle par le BoDV est endémique sur les territoires d'Europe centrale regroupant le Sud et l'Est de l'Allemagne, la Suisse, le Liechtenstein et l'Autriche (Dürrwald *et al.*, 2006). Cependant, de nombreux cas ont été détectés hors zone endémique, aux quatre coins du monde, depuis que le virus est étudié : en Europe de l'Ouest et du Nord, en Asie Mineure, en Asie, en Australie et aux États-Unis d'Amérique. Le réservoir du BoDV est connu comme étant un petit mammifère insectivore de l'espèce des *Crocidura leucodon* : la musaraigne bicolore à dents blanches. Ce petit mammifère développe une infection totalement asymptomatique même si des marqueurs du virus sont présents dans presque tous ses organes : le cerveau, le foie, la rate, la peau, les glandes surrénales et salivaires et dans une moindre mesure les poumons, les reins et les yeux (Puorger *et al.*, 2010).

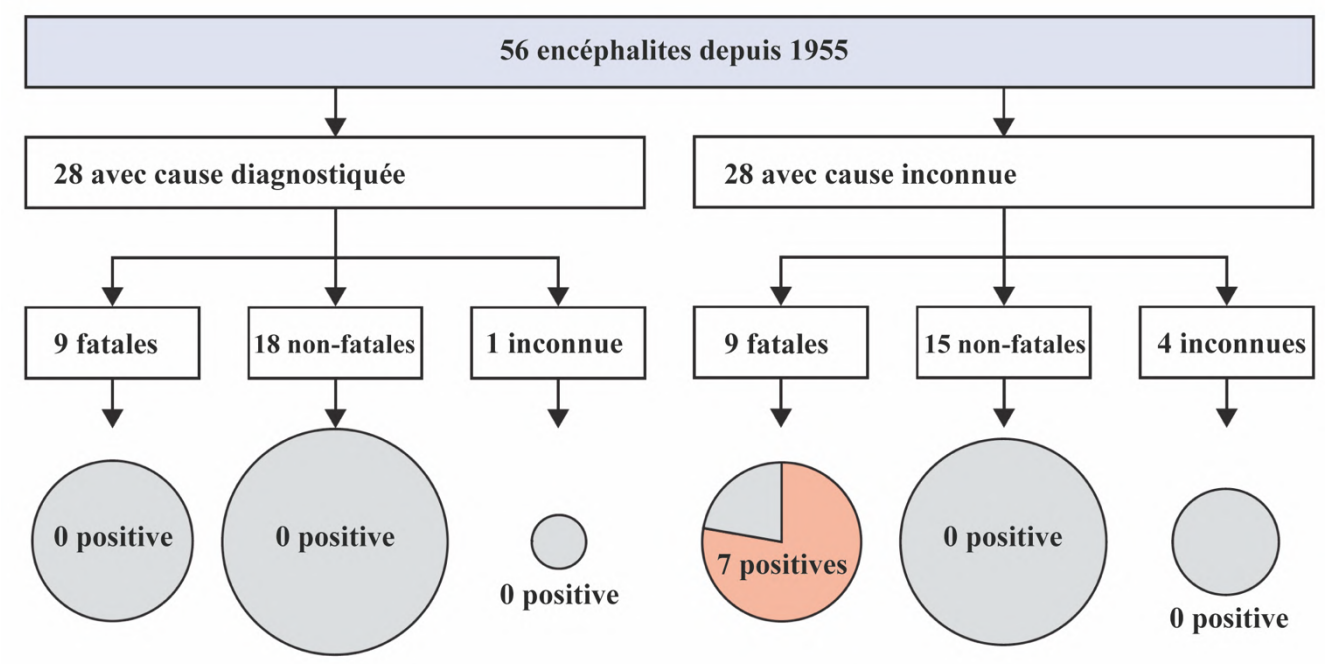


Figure 22 : Analyse rétrospective d'encéphalites virales potentiellement causées par une infection par le BoDV-1 chez l'Homme, à l'Hôpital Universitaire de Regensburg (Allemagne), depuis 1995.

Les biopsies de cerveaux des 56 patients ont été testées par RT-qPCR pour détecter le génome viral. Ensuite, d'autres prélèvements de sérum ou de liquide céphalo-rachidien ont été analysés par RT-qPCR, *immunoblots* ou par immunofluorescence pour étudier la sérologie et confirmer le diagnostic de la présence du génome viral. D'après Niller, 2020.

3.1. *Vie sauvage et animaux domestiques*

Le spectre d'hôte du BoDV est très large. D'abord découvert chez les chevaux, le BoDV s'attaque également aux animaux de ferme ou d'élevage et les animaux de compagnie : les moutons, le bétail, les chats, les chiens ou les lamas.

3.2. *Le BoDV : un virus au potentiel zoonotique*

Entre les années 1990 et le début des années 2000, de très nombreuses études sont publiées, suggérant un rôle de l'infection du BoDV dans le développement de troubles cognitifs (mémoire, apprentissage…) ou de troubles neuropsychiatriques (schizophrénie, bipolarité, dépression, syndrome de fatigue chronique…) (Lipkin *et al.*, 2011). Cependant, certains de ces résultats ont été remis en question après la découverte que les expériences de détection d'une infection par le BoDV de patients en neuropsychiatrie, auraient été compromises par des contaminations des échantillons d'ADN analysés, avec des souches du laboratoire (Schwemmle *et al.*, 1999; Dürrwald *et al.*, 2007).

Entre 2011 et 2013, une approche par métagénomique est réalisée sur trois éleveurs d'écureuils variés (*Sciurus variegatoides*), originaires de Saxe en Allemagne, décédés d'une encéphalite foudroyante de cause inconnue. Ces expériences ont révélées la présence d'un Bornavirus inconnu très similaire à l'espèce de référence BoDV-1 (*Mammalian 1 orthobornavirus)*. La nouvelle espèce *Mammalian 2 orthobornavirus* est donc ainsi créée pour accueillir son premier membre *Variegated squirel bornavirus 1* (VSBV-1) (Hoffmann *et al.*, 2015). L'étude de cas a révélé que deux des trois patients avaient été griffés et le dernier mordu dans le passé, par des écureuils de leurs élevages. Ces résultats ont finalement révélé l'existence d'une forme de Bornavirus capable de franchir la barrière d'espèce et d'induire une zoonose.

Depuis 2018, il a été découvert dans d'autres cas d'encéphalites mortelles chez l'homme, au départ d'origine inconnue, des séquences de Bornavirus identiques aux isolats de BoDV obtenus chez les chevaux et les musaraignes (Korn *et al.*, 2018; Schlottau *et al.*, 2018). Enfin, en 2020, une étude rétrospective menée en Allemagne sur 56 cas d'encéphalites depuis 1995 a mis en évidence que dans le groupe, dont l'encéphalite était inexpliquée, 7 des 9 encéphalites fatales étaient positives à BoDV-1 (Figure 22) (Niller *et al.*, 2020).

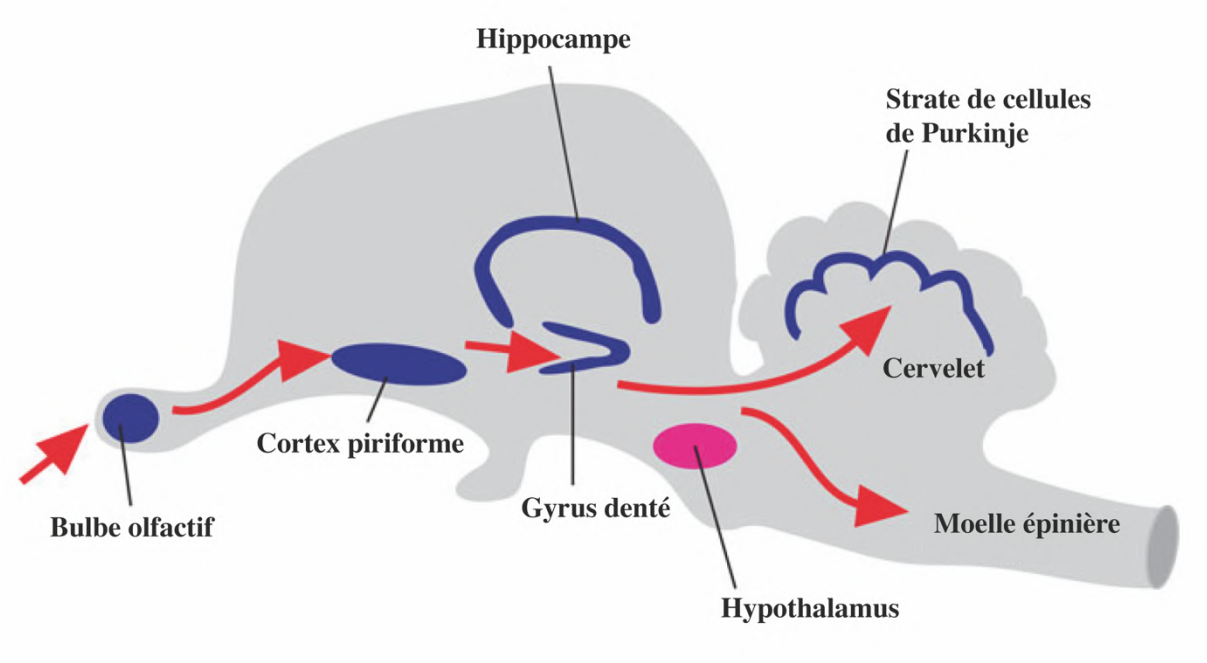


Figure 23 : Schéma de la voie « naturelle » d'invasion du cerveau par le BoDV chez les chevaux.
Après être entré par voie intranasale, le BoDV infecte les neurones olfactifs ce qui lui permet d'accéder au système nerveux central *via* les nerfs olfactifs. Une fois arrivé dans le bulbe olfactif, le virus se dissémine petit à petit depuis le cortex piriforme vers le système limbique puis atteint le cervelet et enfin le SNP *via* la moelle épinière. D'après Tizard, 2016.

Aujourd'hui, le BoDV-1 peut être considéré comme un virus ayant un potentiel zoonotique. Ces découvertes relancent aussi un intérêt dans l'étude du BoDV-1 dans la pathogenèse de maladies neurologiques chez l'Homme, associée ou non à une persistance du virus dans le cerveau.

4. DE L'INFECTION A LA MALADIE : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE BORNA

4.1. *Voie d'infection*

La principale voie d'infection naturelle par le BoDV chez la plupart des mammifères se fait probablement par voie nasale. Les neurones tapissant l'épithélium nasal serviraient de porte d'entrée au virus dans le système nerveux (Morales *et al.*, 1988). Chez des chevaux infectés expérimentalement, les bulbes olfactifs présentent une inflammation et des œdèmes très tôt dans la maladie (Solbrig & Koob, 2003). Tout comme chez le rat infecté, le virus est retrouvé dans le bulbe et le noyau olfactif, mais également dans l'hippocampe (Sauder & Staeheli, 2003).

A la suite d'expériences de titrage dans les fluides biologiques excrétés par des animaux infectés (rats et chevaux), le virus se retrouverait principalement dans les urines, ce qui coïnciderait avec une transmission *via* le système olfactif, suite au reniflement d'urine d'animaux infectés (Morales *et al.*, 1988; Sauder & Staeheli, 2003). Le virus se réplique dans les neurones, aux sites d'entrée initiaux et une fois dans la cellule, la RNP doit pouvoir atteindre le noyau et « se déplacer » le long des axones. La RNP est alors prise en charge par les dynéines des microtubules et voyage dans des endosomes de signalisation. Afin d'atteindre le SNC, le virus migrerait en suivant les prolongements axonaux vers et à travers le cerveau (Figure 23) (Clemente *et al.*, 2010; Charlier *et al.*, 2016). Des expériences avec un virus marqué, ont aussi mis en évidence la capacité de celui-ci à se transmettre de proche en proche, de cellule à cellule (Charlier *et al.*, 2013).



Figure 24 : Signes cliniques de la maladie de Borna chez les chevaux à différentes phases de la maladie.
(A) Stade précoce de la maladie. Les chevaux présentent des troubles de la prise alimentaire et de la mastication. **(B)** Stade plus avancé de la maladie. Les chevaux infectés présentent des troubles de la posture, de la proprioception et une paralysie des nerfs faciaux. **(C)** Stade plus tardif de la maladie. Les chevaux infectés souffrent de torticolis et réalisent des mouvements de poussées au mur pour tenter de faire diminuer la pression intra-crâniale. D'après Fields, 2013 (Herden *et al.*, 2013).

4.2. *Signes cliniques*

Les conséquences de l'infection sont très hétérogènes et varient en fonction de l'espèce infectée, de la souche virale et de l'intensité de la réponse immunitaire. Les signes cliniques de la maladie de Borna peuvent être inapparents, subtils, tels que quelques perturbations du comportement ou bien plus graves avec le développement de méningo-encéphalites foudroyantes accompagnées de nombreuses lésions dans la matière grise du cerveau, mais aussi dans la moelle épinière (Figure 24) (Richt *et al.*, 2000). Cependant, l'infection par le BoDV chez le cheval est le plus souvent asymptomatique, des études épidémiologiques indiquent ainsi une prévalence non négligeable du BoDV chez les chevaux « sains » (Hagiwara *et al.*, 1997).

4.3. *Modèles d'étude*

Les modèles expérimentaux offrent des outils de simplification pour décrire les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors de l'infection par le BoDV. L'étude de la maladie de Borna a d'abord commencé sur les chevaux infectés naturellement par le virus. Cependant, la difficulté d'élevage et la manutention que représente l'étude sur un « gros » modèle tel que le cheval ont poussé les chercheurs à induire des infections sur des hôtes non-naturels. Les modèles expérimentaux se sont alors développés autour des deux rongeurs les plus communs en laboratoire : la souris et le rat. Chez les rongeurs, l'infection expérimentale par le BoDV se réalise principalement par une injection intracérébrale du virus mais peut également se réaliser par une inoculation intraoculaire ou intranasale. La souris est une espèce naturellement résistante à l'infection par le BoDV. Néanmoins, il a été possible d'adapter certaines souches virales à des lignées murines afin qu'elles deviennent susceptibles à l'infection (Kao *et al.*, 1984). Après injection intracérébrale, les souris de souche susceptible développent des signes neurologiques après 4 à 6 semaines. L'infection se caractérise, entre-autre, par une infiltration de LT CD8+ induisant la mort des neurones infectés et menant à des lésions dans le cerveau (Hausmann *et al.*, 1999). Finalement, toutes les souris susceptibles infectées seront amenées à mourir d'une encéphalite (Hallensleben *et al.*, 1998). Le modèle murin d'infection par le BoDV est donc très intéressant pour étudier les caractéristiques immunopathologiques de l'encéphalite suite à l'infection. Néanmoins, il reste assez éloigné de la pathologie rencontrée lors de l'infection naturelle par le virus.

Nous verrons dans le chapitre suivant que le modèle le plus fidèle est le modèle du rat qui présente une symptomatologie variée et très similaire à celle rencontrée dans l'infection naturelle du cheval. Aussi, nous aborderons la pertinence de l'étude *in vitro* de l'infection des neurones au BoDV afin de s'affranchir du rôle de cellules immunitaires et de se focaliser sur le rôle direct du virus sur le neurone.

4.3.1. *In vivo* : le modèle du rat

Le modèle le plus commun pour étudier la physiopathologie de l'infection par BoDV est le rat. Toutes les lignées de rats ne présentent pas la même sensibilité à l'infection (Herzog *et al.*, 1991). Le rat Lewis présente une plus grande sensibilité à l'infection et cette lignée est de ce fait la plus utilisée en laboratoire. Ce modèle est tout particulièrement intéressant puisqu'il est possible de reproduire avec une grande similitude l'infection de l'hôte naturel. Il permet notamment d'observer *in vivo*, les deux facettes de la maladie de Borna. En effet, le type de syndrome observé dépend en grande partie des conditions expérimentales de l'infection et, plus particulièrement, de l'âge du rat auquel est réalisé l'infection.

D'une part, l'infection d'un rat adulte immunocompétent avec le BoDV-1 conduit à une encéphalite très similaire à ce qui est observé chez les chevaux ou les moutons (Stitz *et al.*, 2002). Les premiers symptômes se manifestent 10 à 20 jours après l'inoculation intracérébrale du virus et se caractérisent par une forte inflammation. Cette inflammation est déclenchée par l'infiltration de lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ et de macrophages, mais également par l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie (Deschl *et al.*, 1990; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). L'infection de neurones par le BoDV induit une augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) à la surface de ces cellules, les rendant plus susceptibles d'être reconnues par les LT CD8+ (Chevalier *et al.*, 2011). Même si l'infection par le BoDV est, en soit, non cytolytique, les LT CD8+ sont les principaux effecteurs de la destruction neuronale conduisant à des lésions dans plusieurs régions du cerveau (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Les animaux souffrent d'abord de dysfonctions motrices, d'ataxie, d'altérations comportementales, d'hyperactivité et une partie décède dans les 1 à 4 mois après l'infection. Les survivants ont une inflammation qui se résorbe et développent une maladie chronique, avec le virus qui persiste à vie dans les neurones. Ils souffrent alors de troubles du comportement qui s'aggravent (démence, passivité…), d'apathie et de dépression, associés à de la perte de « matière » au niveau du cortex et du système limbique suite à l'encéphalite et de la mort neuronale associée.

D’autre part, l’infection d’un rat nouveau-né conduit à une infection persistante, sans inflammation appréciable et sans mort de l’animal. Ce modèle en devient donc pertinent pour étudier les conséquences d’infection virale sur le CNS et en particulier sur les circuits neuronaux en développement. Les rats présentent alors des troubles neuro-développementaux tels qu’une hyperactivité, des troubles de la mémoire et de l’apprentissage (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2005). Après 3 semaines d’infection, le BoDV est présent dans tout le cerveau et infecte même les cellules gliales, conduisant à une astrogliose et une microgliose, sans le développement d’une neuroinflammation massive, et atteint également le SNP. L’infection de ce modèle est associé à une altération de la neurogenèse de neurones adultes au niveau du système limbique et du cervelet (Hornig *et al.*, 2001). La conséquence est une diminution du nombre de neurones matures dans ces endroits précis du cerveau (Gonzalez-Dunia *et al.*, 2005). En effet, ces modèles présentent moins de neurones matures dans le gyrus denté (zone de l’hippocampe) qui peuvent être corrélés avec les troubles de l’apprentissage et de la mémorisation dont souffrent ces rats (Hornig *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1999).

Malgré la grande similitude des symptômes observés avec le modèle d’infection du rat à la naissance et l’infection naturelle chez le cheval, les troubles neurodéveloppementaux du modèle rat ne permettent pas de rendre compte de la contribution stricte des perturbations des fonctions neuronales aux altérations de comportement. C’est pourquoi, le modèle d’infection de cellules *in vitro* apparait comme un modèle de choix pour étudier les conséquences directes de l’infection du BoDV sur les fonctions du neurone, en permettant de s’affranchir de mécanismes indirects liés aux modèles *in vivo*.

4.3.2. *In vitro* : des lignées cellulaires à la culture primaire

Le BoDV-1 possède un tropisme très large *in vitro* puisqu’il peut infecter plusieurs types et lignées cellulaires (Danner, 1974). Les lignées cellulaires classiques comme les cellules Vero issues de cellules épithéliales de rein de singe ou les cellules MDCK issues de cellules épithéliales de rein de chien sont susceptibles à l’infection mais restent très éloignées des cellules neuronales. Des modèles de lignées cellulaires dérivant de cellules neurales sont aussi utilisées pour étudier le BoDV-1 : les cellules OL dérivées d’un oligodendrogliome de rat et les cellules SH-SY5Y dérivées d’un neuroblastome humain. Ces modèles ont permis de mettre en évidence que le BoDV-1 se réplique en étroite interaction avec la chromatine et qu’il peut se disséminer ainsi en accompagnant les chromosomes lors de la mitose (Matsumoto *et al.*, 2012).

Encore une fois même si ces modèles se rapprochent les plus de neurones, ces cellules restent mitotiques et sont donc éloignées des neurones matures post-mitotiques, cible préférentielle du BoDV. Le meilleur modèle actuel pour étudier l'impact du BoDV-1 sur la physiologie neuronale est donc la culture primaire de neurones et cela a plusieurs avantages. D'abord, l'infection par BoDV-1 en culture primaire de neurones est plutôt lente mais permet d'obtenir au bout de 12 à 15 jours, une infection persistante de 100% des cellules et sans mort neuronale associée (Hans *et al.*, 2004). Ensuite, lors de la dissection il est possible de récupérer des neurones d'une région précise, hippocampe ou cortex afin de cibler l'impact sur une zone du cerveau. Enfin, cela permet d'être plus fidèle à l'infection naturelle et d'étudier l'impact du BoDV-1 sur des mécanismes très régulés dans les neurones post-mitotiques comme par exemple les mécanismes impliqués dans la plasticité neuronale. Cette approche, que nous maitrisons au laboratoire, permet donc d'appréhender avec précision des perturbations des fonctions neuronales par l'infection qui pourrait causer les troubles comportementaux observés au cours de la maladie.

4.4. *Le BoDV, un virus persistant*

Les infections de l'organisme hôte peuvent être catégorisés selon leur durée : rapides et spontanément résolutives (infections aiguës) ou à long terme (infections chroniques). Les infections chroniques résultent d'une non élimination d'un pathogène, par le système immunitaire, suite à une infection aiguë.

Plusieurs mécanismes ont été développés par les virus pour leur permettre de ne pas être éliminés. En effet, certaines protéines virales peuvent moduler la réponse immune en inhibant, par exemple, la présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Un autre moyen pour échapper à la réponse immunitaire pour les virus est d'infecter des sanctuaires immunitaires comme le SNC ou les cellules immunitaires elles-mêmes. Ces mécanismes sont utilisés sous différentes formes dans les infections chroniques dites latentes *vs.* persistantes.

D'une part, les infections chroniques peuvent présenter des phases de latence durant lesquelles la réplication du génome et la production de particules sont arrêtées. Ces phases alternent avec des phases de réactivation où la production virale est relancée en fonction de facteurs environnementaux comme c'est le cas des virus *Herpes*. Ceci permet alors de maintenir la production de facteurs viraux et donc d'antigènes potentiels à un minimum. D'autre part, les infections chroniques peuvent être considérées comme persistantes avec une production

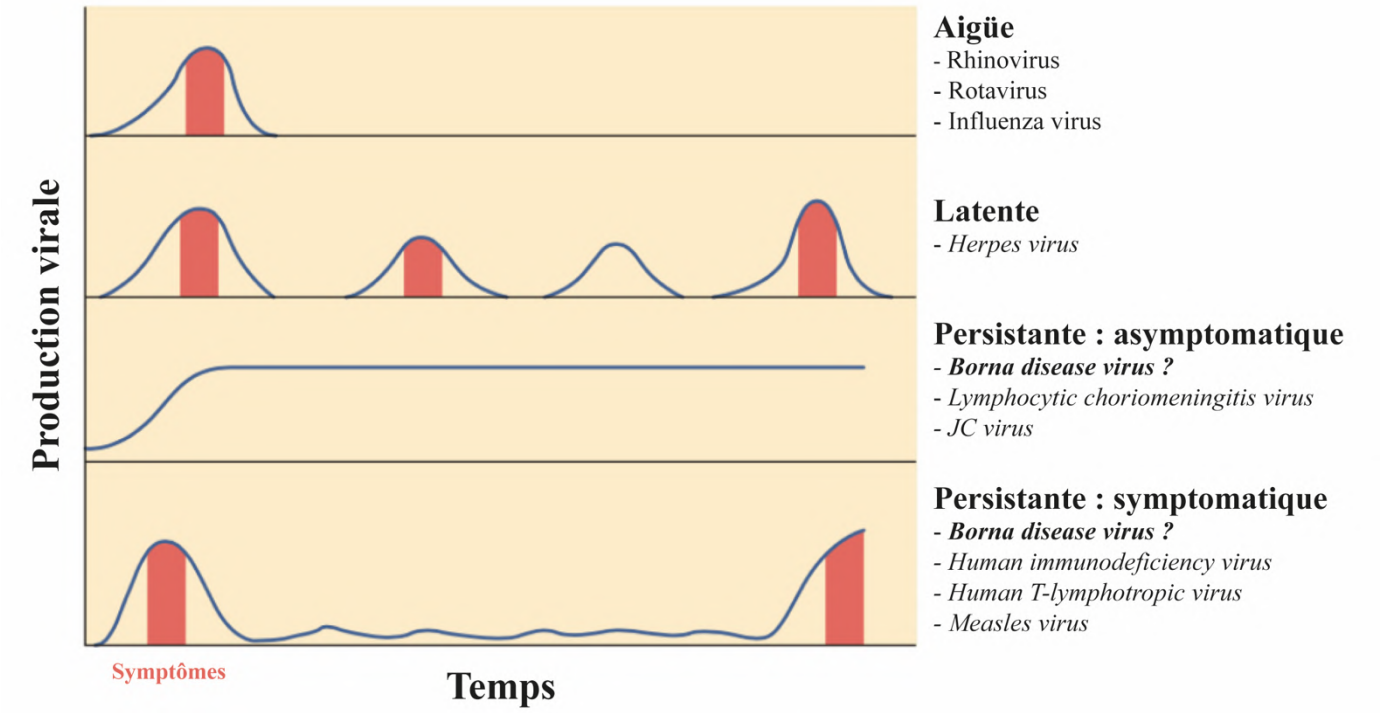


Figure 25 : Les principaux modèles d'infections virales.
Les données actuelles ne permettent pas actuellement de classer le BoDV dans l'un ou l'autre des modèles de persistance puisque les études sont limitées sur l'hôte naturel et l'hôte réservoir. Adapté de *Principles of Virology* (Flint *et al.*, 2015)

continue de génomes, de protéines et de particules virales. C'est le cas du virus de la rougeole (*Measles virus*), du virus JC, du virus d'immunodéficience humaine (VIH) et du BoDV (Figure 25) (Flint *et al.*, 2015). En infectant principalement les neurones du SNC, le BoDV peut donc persister sans être soumis à une forte pression de la réponse immune. Le BoDV met également en place plusieurs mécanismes d'échappement à l'immunité innée. Ces mécanismes ciblent principalement les récepteurs de reconnaissance de pathogènes (PRR), ou senseurs, et le système interféron (IFN) de type I de l'hôte, au rôle primordial dans la réponse antivirale innée (García-Sastre & Biron, 2006). Pour échapper à sa détection par les PRR et en particulier RIG-I (*Retinoid Inducible Gene I*), un important senseur de petits ARN viraux 5' triphosphate et activateur de la voie IFN, le BoDV est capable d'échanger le triphosphate présent en 5' de son ARN génomique contre un monophosphate (Habjan *et al.*, 2008). En aval de la signalisation RIG-I se trouve MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling protein)* une protéine mitochondriale capable d'induire l'apoptose suite à la détection de pathogènes. Dans un modèle de lignée cellulaire (cellules OL), la protéine X du BoDV interagit avec MAVS à la mitochondrie et est capable de bloquer le programme d'induction d'apoptose causé par la détection du BoDV (Li *et al.*, 2013). Certaines protéines du BoDV sont également capables d'agir à différents niveaux de la voie de signalisation IFN de type I, notamment en interférant avec la localisation nucléaire d'IRF7 (*Interferon regulatory factor 7*) (Song *et al.*, 2013) ou en détournant des kinases essentielles à la cascade de signalisation de l'IFN de type I, telle que TBK-1 (*TANK-binding kinase 1)* (Unterstab *et al.*, 2005).

La persistance du BoDV dans les neurones, avec une expression continue de protéines virales, conduit à des altérations dans la physiologie neuronale.

4.5. *Impact de l'infection sur la physiologie neuronale*

Dans certains cas, l'infection par le BoDV de son hôte naturel le cheval, conduit à une encéphalite foudroyante. En phase aiguë d'infection, la méningo-encéphalite est causée par une forte inflammation associée à une infiltration de LT CD4+ et CD8+. Ces derniers ciblent alors les neurones infectés pour les détruire. Aussi, l'infection des neurones active les astrocytes qui à leur tour activent la microglie provoquant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires neurotoxiques (Ovanesov *et al.*, 2006, 2008). Les astrocytes infectés peuvent également mener à de l'excitotoxicité par la perte de leur capacité de recapture du glutamate (Billaud et al., 2000).

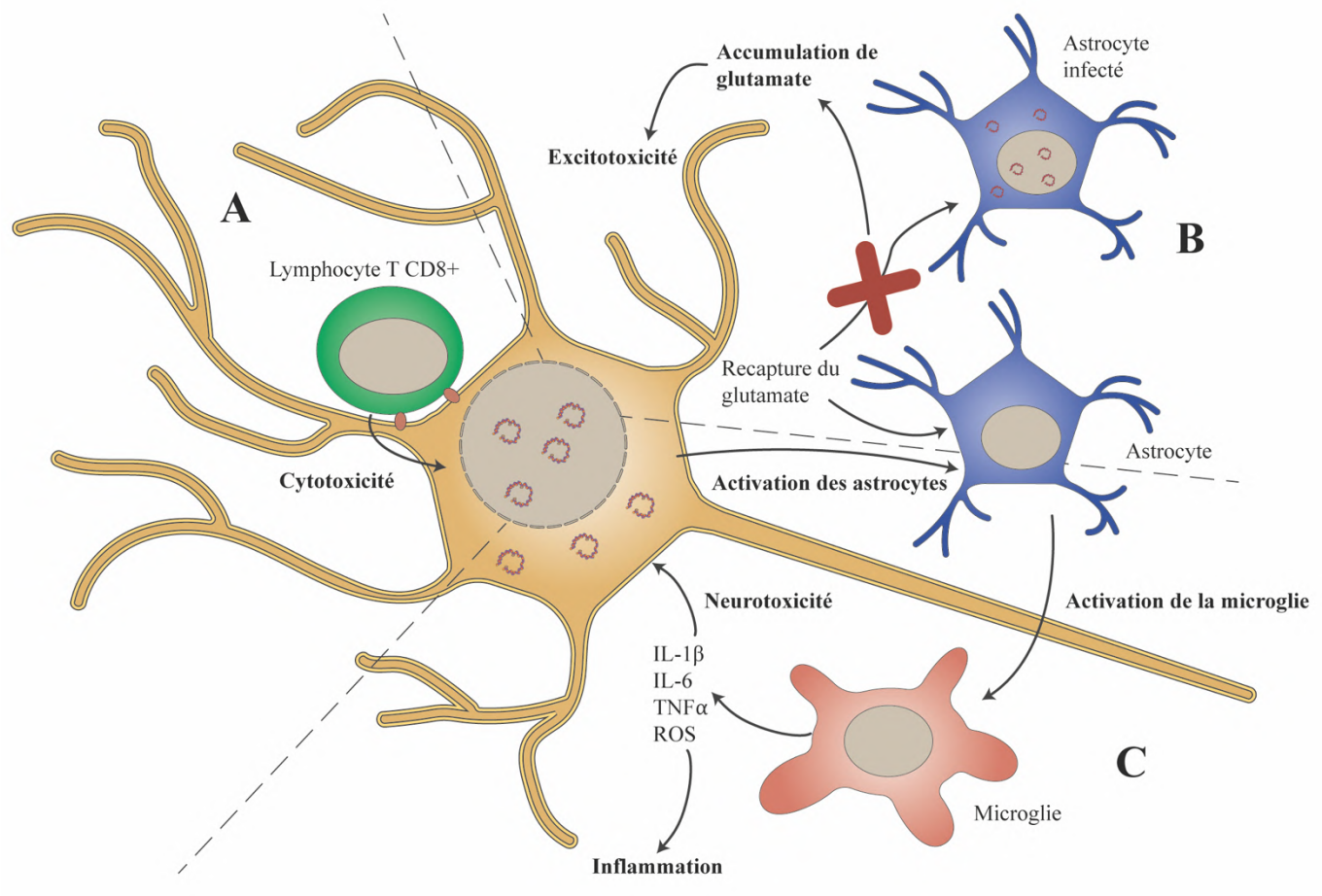


Figure 26 : Schéma des trois principaux mécanismes de mort des neurones médiés indirectement par une infection par le BoDV *in vivo*.
(A) La cytotoxicité induite par la réponse LT CD8+ va tuer les neurones infectés. **(B)** Les astrocytes infectés ont leurs fonctions altérées dont la recapture du glutamate, conduisant à une accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire et des stimulations excitotoxiques des neurones. **(C)** Les astrocytes activés par les neurones infectés vont à leur tour activer la microglie qui va sécréter de nombreuses molécules proinflammatoires dans des quantités neurotoxiques. Adapté de Tizard, 2016.

L'ensemble de ces observations montre bien que la mort neuronale *in vivo* n'est pas directement induite par l'infection du neurone mais par des mécanismes impliquant d'autres acteurs cellulaires et médiateurs solubles (Figure 26) (Tizard *et al.*, 2016).

L'étude de l'infection par BoDV dans des modèles *in vitro* permet de s'affranchir du développement d'une encéphalite qui s'accompagne du recrutement de cellules immunitaires périphériques et de l'activation des cellules gliales. Ces modèles permettent ainsi d'analyser les effets directs de l'infection par le BoDV sur la physiologie neuronale et quelles pourraient en être les conséquences sur le comportement.

4.5.1. Protection contre le stress oxydatif

La protéine X du BoDV est une protéine qui a une affinité toute particulière pour la mitochondrie et qui est capable d'inhiber l'apoptose des neurones infectés (Poenisch *et al.*, 2009). La protéine X dispose également dans sa région carboxy-terminale d'une activité neuroprotectrice contre le stress oxydatif (Szelechowski *et al.*, 2014). En effet, la protéine X protège les neurones de la fragmentation axonale induite par des agents toxiques pour les mitochondries. Aussi, l'administration intranasale d'un peptide dérivé de la protéine X (contenant la région carboxy-terminale) prévient la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques dans un modèle murin aigu d'induction de la maladie de Parkinson (Szelechowski *et al.*, 2014).

4.5.2. Effets sur les voies de signalisation

L'infection par le BoDV perturbe diverses voies de signalisation impliquées dans les phénomènes de plasticité synaptique. Une de ces voies est la voie MAPK/ERK (*mitogen-associated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase)* dont le rôle crucial, entre autres, dans la mise en place de la potentialisation synaptique à long terme, a été détaillé précédemment dans la première partie (Thomas & Huganir, 2004) ; le BoDV semble avoir des effets différents sur la voie en fonction du moment de l'infection. En effet, dans les étapes précoces de l'infection (quelques heures après le début de l'infection), la voie ERK est constitutivement activée et favorise la réplication du virus. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique pour bloquer cette voie conduit à une forte diminution de la dissémination du BoDV. Par contre, le même traitement sur une culture avec une infection déjà bien établie, ne permet pas de réduire la production du virus. Ainsi, dans ce cas, l'activation de la voie ERK

permettrait de favoriser les étapes précoces de la réplication et la dissémination du virus (Planz *et al.*, 2001).Dans un autre contexte d'étude, le BoDV a été impliqué dans l'inhibition de l'activation de la voie ERK suite à la stimulation des neurones par des neurotrophines dont le BDNF (*brain derived neurotrophin factor)* (Hans *et al.*, 2004). Ceci engendre une inhibition de la synaptogenèse, c'est-à-dire la formation et le renforcement de synapses, lesquelles reposent sur la stimulation au BDNF. Les synapses renforcées permettent la potentialisation de la transmission synaptique. De ce fait, même si, à l'état basal les neurones infectés ne présentent pas moins de synapses que les neurones non infectés, la stimulation au BDNF n'augmentent plus le nombre de synapse à la surface des neurones infectés. De façon intéressante, la voie parait détournée au profit du virus puisque la stimulation au BDNF favorise la réplication du BoDV dans les cellules, sans pour autant que les mécanismes moléculaires impliqués n'aient été identifiés.

Le rôle de la phosphoprotéine P dans les perturbations des voies de signalisation semble être prépondérant. La simple expression de façon isolée de la phosphoprotéine P, par injection stéréotaxique de vecteurs lentiviraux dans l'hippocampe de souris, suffit à provoquer des troubles de la mémorisation et de l'apprentissage (Bétourné *et al.*, 2018). Premièrement, la phosphoprotéine P peut interagir avec la protéine GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), protéine structurale du principal récepteur inhibiteur dans le cerveau. Cette interaction provoque la relocalisation de la protéine GABARAP du cytoplasme vers le noyau inhibant la signalisation GABAergique (Peng *et al.*, 2008). De plus, la protéine P altère la production de facteurs importants pour la neurogenèse et à la différenciation des neurones et cible plus particulièrement la différenciation des neurones inhibiteurs GABAergiques (Scordel *et al.*, 2015). La phosphoprotéine P est aussi utilisée par le BoDV comme « substrat leurre », une stratégie très répandue chez les virus pour interférer ou détourner certaines voies de signalisation à leur avantage. C'est-à-dire que la protéine présente des sites d'interaction et de modifications post-traductionnelles qui peuvent être reconnus et utilisés par des protéines de la cellule hôte. Ainsi, dans le cas d'une infection par le BoDV, la phosphoprotéine P est le « substrat leurre » d'une kinase dont le rôle est central dans les voies de signalisations neuronales et la plasticité synaptique : la protéine kinase C (PKC) (Citri & Malenka, 2008). Le rôle de la PKC est de phosphoryler des protéines de signalisation en réponse à la stimulation neuronale ou d'un signal provenant d'une neurotrophine. La phosphoprotéine P du BoDV, reconnue par la PKC, est phosphorylée par cette dernière qui ne pourra plus remplir son rôle dans les voies dans lesquelles elle est impliquée (Schwemmle *et al.*, 1997).

De cette interférence avec la PKC, découlent de nombreux effets qui sont détaillés dans la suite de la section.

4.5.3. Effets sur les vésicules synaptiques

Le recyclage des vésicules synaptiques (VS) est un bon indicateur de l'activité des synapses suite à la stimulation puisqu'il est important pour la plasticité synaptique (Malgaroli *et al.*, 1995). Parmi les cibles de phosphorylation de la PKC on trouve les protéines SNAP25 (*synaptosomal-associated protein, 25kDa*) et MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) qui sont des protéines impliquées dans la plasticité neuronale, en participant au recyclage des VS (Antonucci *et al.*, 2016). En condition d'infection par le BoDV, la phosphoprotéine P interfère avec la PKC empêchant la phosphorylation de SNAP25 et de MARCKS à la suite d'une stimulation (Volmer *et al.*, 2006; Prat *et al.*, 2009). De façon surprenante, l'infection n'altère pas le recyclage constitutif des VS en l'absence de stimulation. Mais, en réponse à une stimulation, les neurones infectés ne montrent pas d'augmentation du recyclage des VS, ce qui diminue les capacités « plastiques » des neurones (Volmer *et al.*, 2006).

4.5.4. Effets sur l'activité neuronale

L'activité électrique des neurones infectés a pu être analysée à l'aide d'un dispositif MEA (*micro electrode array*) qui permet d'enregistrer en temps réel et en continu l'activité des réseaux neuronaux. Il permet également l'ajout de drogues pour moduler l'activité électrique. Ainsi, les cultures de neurones infectés ne semblent pas présenter de modifications significatives de l'activité spontanée, ni de modifications dans l'augmentation de l'activité induite après une stimulation pharmacologique. En revanche, les neurones infectés présentent un déficit dans les phénomènes de renforcement et de potentialisation de l'activité neuronale qui participent à la plasticité synaptique (Volmer *et al.*, 2007). Cependant, l'activité spontanée et induite à l'échelle du neurone unique, en condition d'infection, n'a encore jamais été explorée.

4.5.5. Effets sur l'épigénétique neuronale

La présence de la RNP dans le noyau aussi bien que la grande proximité des vSPOT de la chromatine soulèvent des questionnements quant à l'impact du virus sur l'épigénétique neuronale. Dans un modèle de cellules OL, une dizaine de miARN ont été découverts comme dérégulés par l'infection à BoDV (Zhang *et al.*, 2016). Par exemple, le miR-146a est surexprimé dans les cellules OL infectées mais également dans les neurones *in vivo* (Zhang *et al.*, 2019). Ce miARN favoriserait la réplication du virus en interférant avec la voie NF-κB qui s'active en réponse à une stimulation par des cytokines ou des facteurs pro-apoptotiques. Une étude protéomique de neurones infectés *in vitro* a mis en évidence une diminution de l'expression de MeCP2 mais aussi une diminution de l'acétylation de l'histone H2B (Suberbielle *et al.*, 2008).

Au cours de l'infection, la diminution de l'acétylation de l'histone H2B est causée par la diminution de l'activité des HAT (Bonnaud *et al.*, 2015). Pour être actives, les HAT doivent être phosphorylées par la PKC. Dans les neurones infectés, la PKC est détournée de ses fonctions par la phosphoprotéine P et ne peut plus phosphoryler les HAT. Par conséquent, la quantité d'acétylation des histones est diminuée ce qui impacte la compaction de la chromatine et *in fine* modifie l'expression de certains gènes. De façon surprenante, en inhibant pharmacologiquement l'acétylation des histones en bloquant l'action des HAT, la réplication virale est diminuée (Bonnaud *et al.*, 2015). Ces informations suggèrent que le BoDV, en modulant l'épigénétique de la cellule hôte, est capable de réguler sa propre réplication. Cette baisse d'acétylation a également été observée directement dans l'hippocampe de rats infectés et associée à des troubles de la mémorisation (Jie *et al.*, 2018). En revanche, les mécanismes sous-jacents de ce rétrocontrôle sur la réplication du virus ne sont à ce jour pas encore connus. Dans le même modèle, la quantité d'histone H3 acétylée est diminuée, conduisant à une réduction de l'expression de gènes importants pour la neuroplasticité comme le BDNF. Des traitements par des HDAC permettent de réduire en partie les troubles de la mémorisation associés à ce défaut d'acétylation (Jie *et al.*, 2018).

Ainsi, l'impact du BoDV sur la physiologie neuronale dépend du modèle animal ou cellulaire (lignée ou culture primaire de neurones), du moment de l'infection et de la phase du cycle de réplication. Chaque élément pris séparément ne peut expliquer l'ensemble des perturbations sur le fonctionnement des neurones ou des lésions observées dans les tissus.

Mais, mis bout à bout, il est possible d'avoir une vision d'ensemble d'une multitude de mécanismes qui peuvent impacter le fonctionnement neuronal en condition « normale » ou pathologique.

Le BoDV apparait donc comme un modèle de choix pour étudier les maladies du SNC et les dysfonctions neuronales associées à la persistance d'un virus dans les neurones, sans mort neuronale associée. De plus, l'impact de l'infection sur l'épigénétique neuronale est encore très peu décrit et l'étroite interaction de la RNP du BoDV avec la chromatine suggère que le vSPOT pourrait avoir d'autres effets sur les modifications de la chromatine.

IV. LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES DANS LA NEUROINFLAMMATION

1. L'INFLAMMATION DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des mécanismes et des acteurs de défense qui permettent à un organisme de discriminer le soi du non-soi. En mettant de côté les barrières naturelles du corps telles que la peau ou les muqueuses, le système immunitaire est composé de différents types cellulaires communiquant entre eux par des médiateurs solubles ou membranaires. Communément, il est considéré qu'il y a deux types d'immunité : l'immunité innée, rapide mais non spécifique et l'immunité adaptative, plus lente mais spécifique donc plus efficace. L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme. Elle est mise en jeu immédiatement après une agression extérieure. Elle se base sur la reconnaissance par des récepteurs de type PRR (*Pattern recognition receptor*), de motifs communs à un grand nombre de micro-organismes pathogènes : les PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) ou de signaux de dangers émis par des cellules « anormales » : les DAMP (*danger associated molecular pattern*). Enfin, elle fait intervenir plusieurs types cellulaires dont les monocytes/macrophages, capables entre autres, de phagocyter les pathogènes. En deuxième ligne, l'immunité adaptative est activée par des cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques, qui sont au carrefour entre les deux types d'immunité. Les cellules dendritiques peuvent présenter aux lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) des antigènes, issus de pathogènes dégradés, pour les activer. Les LT CD4+ sont considérés comme des lymphocytes auxiliaires ou *helper*. En effet, une fois activés ceux-ci vont à leur tour activer deux types de cellules effectrices les LT CD8+ dits cytotoxiques et les lymphocytes B (LB). Les premiers ont pour rôle d'induire la mort des cellules infectées par divers mécanismes dont la sécrétion de facteurs cytolytiques comme la perforine ou induire l'apoptose par interaction ligand/récepteur. Les deuxièmes, vont produire des anticorps spécifiques du pathogène rencontré pour le neutraliser. De plus, ces LT et LB peuvent devenir « mémoire », c'est-à-dire qu'ils seront en capacité de s'activer plus rapidement et efficacement en cas de nouvelle rencontre avec l'agent infectieux. Tous ces mécanismes sont entretenus et permis par un ensemble de réactions, de migration de cellules et de sécrétions de molécules regroupées sous l'appellation d'inflammation.

L’inflammation est un processus de défense immunitaire face à des agressions externes ou internes pouvant être de nature infectieuse, physique, chimique ou métabolique. Il est très difficile de donner une définition précise de ce qu’est l’inflammation du fait de son caractère multifactoriel. Il peut être cependant dit qu’elle possède trois principales fonctions : éliminer la cause de l’agression, nettoyer le tissu endommagé et initier la réparation tissulaire. Elle fait intervenir plusieurs acteurs, allant des cellules immunitaires dites résidentes (macrophages, etc…), aux cellules immunitaires circulantes (LT, etc…) et aux médiateurs chimiques comme les cytokines ou les chimiokines.

Le système nerveux possède son propre système immunitaire ainsi que des mécanismes d’inflammation spécifiques appelés « neuroinflammation », tout en interagissant avec les cellules immunitaires systémiques.

1.1. *Le concept de la neuroinflammation*

La neuroinflammation regroupe l’ensemble des processus de surveillance, de défense et de réparation du SNC. Enfermé dans la boîte crânienne, le cerveau est peuplé de cellules qui ont un pouvoir de régénération limité. Il ne peut donc pas supporter une importante réaction inflammatoire telle qu’elle se déroule en périphérie, sans subir de graves dommages. C’est pourquoi, il a développé une façon originale de lutter contre les attaques qu’il reçoit.

1.1.1. La barrière hémato-encéphalite : une barrière sélective

Longtemps considéré comme un organe coupé de la périphérie, le cerveau dispose en réalité d’une barrière sélective et étroitement contrôlée appelée la barrière hémato-encéphalique (Saunders *et al.*, 2014). La BHE a un rôle essentiel de régulation des échanges d'ions, d'oxygène et de nutriments entre les compartiments du sang et du cerveau. Elle joue également un rôle crucial dans la protection du parenchyme nerveux fragile en limitant l'invasion par des agents pathogènes ou des toxines. Aujourd’hui, la BHE est également appelée unité neurovasculaire (UNV) pour mieux rendre compte de la dynamicité de cette structure à l’interface entre le système vasculaire et le tissu neuronal environnant.

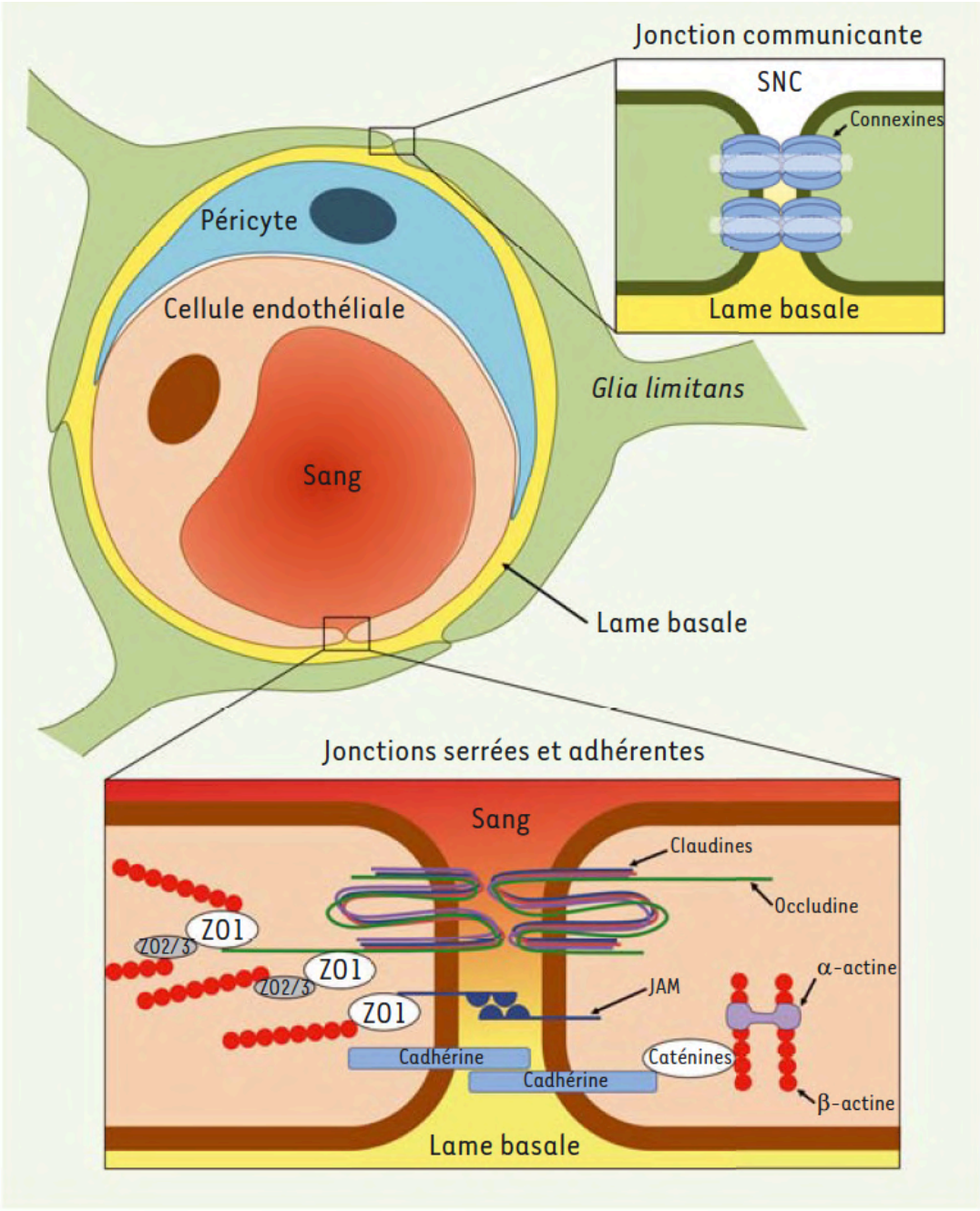


Figure 27 : Illustration de l'organisation de l'unité neurovasculaire.
D'après Renaud, 2015.

Les UNV sont formées de cellules endothéliales qui entourent les capillaires formant le vaisseau sanguin en tant que tel. Ces cellules endothéliales sont liées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes. Les vaisseaux sont ensuite entourés de péricytes (rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales) puis d'une lame basale servant de support à des pseudopodes d'astrocytes qui forme la *glia limitans*. Les pseudopodes sont également reliés par des jonctions communicantes et adhérentes permettant de moduler la morphologie et la perméabilité de l'UNV (Figure 27) (Renaud *et al.*, 2015). Même en conditions physiologiques, ces structures ne sont pas imperméables puisqu'elles permettent, de manière étroitement régulée, l'entrée de cellules immunitaires périphériques circulantes (Louveau *et al.*, 2015). Aussi, la BHE peut être perméable également à certaines molécules, comme les cytokines, par des mécanismes de diffusion passive, de transporteurs ou d'endocytose puis exocytose (Banks *et al.*, 1995).

Du fait des caractéristiques de perméabilité de l'UNV, l'inflammation périphérique peut donc conduire à une neuroinflammation centrale.

1.1.2. Inflammation périphérique et neuroinflammation centrale

La neuroinflammation peut avoir deux origines. Une origine locale avec une activation des cellules résidentes du SNC ou une origine périphérique où, dans ce cas, l'inflammation périphérique entraine l'activation des cellules du SNC. Des infections du cerveau par des pathogènes neurotropes peuvent induire une neuroinflammation qui peut évoluer vers une encéphalite potentiellement létale (Klein *et al.*, 2019). Des chocs physiques à la tête ou des ischémies peuvent également être sources d'une neuroinflammation localisée (DiSabato *et al.*, 2016). Dans ces conditions, la microglie est activée par détection de PAMP, ou de DAMP issues de neurones endommagés et va déclencher une cascade neuroinflammatoire pour rétablir l'homéostasie du cerveau.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la BHE constitue une barrière de perméabilité sélective entre la périphérie et le SNC. Néanmoins, il est maintenant bien connu que certains facteurs solubles et même des cellules immunitaires issues de la périphérie peuvent franchir cette barrière (Daneman & Prat, 2015). L'inflammation périphérique peut aussi, dans certains cas, altérer la BHE, qui devient vulnérable et perd ses capacités de barrière. Ces altérations peuvent être physiques ou non physiques (Figure 28) (Varatharaj & Galea, 2017).

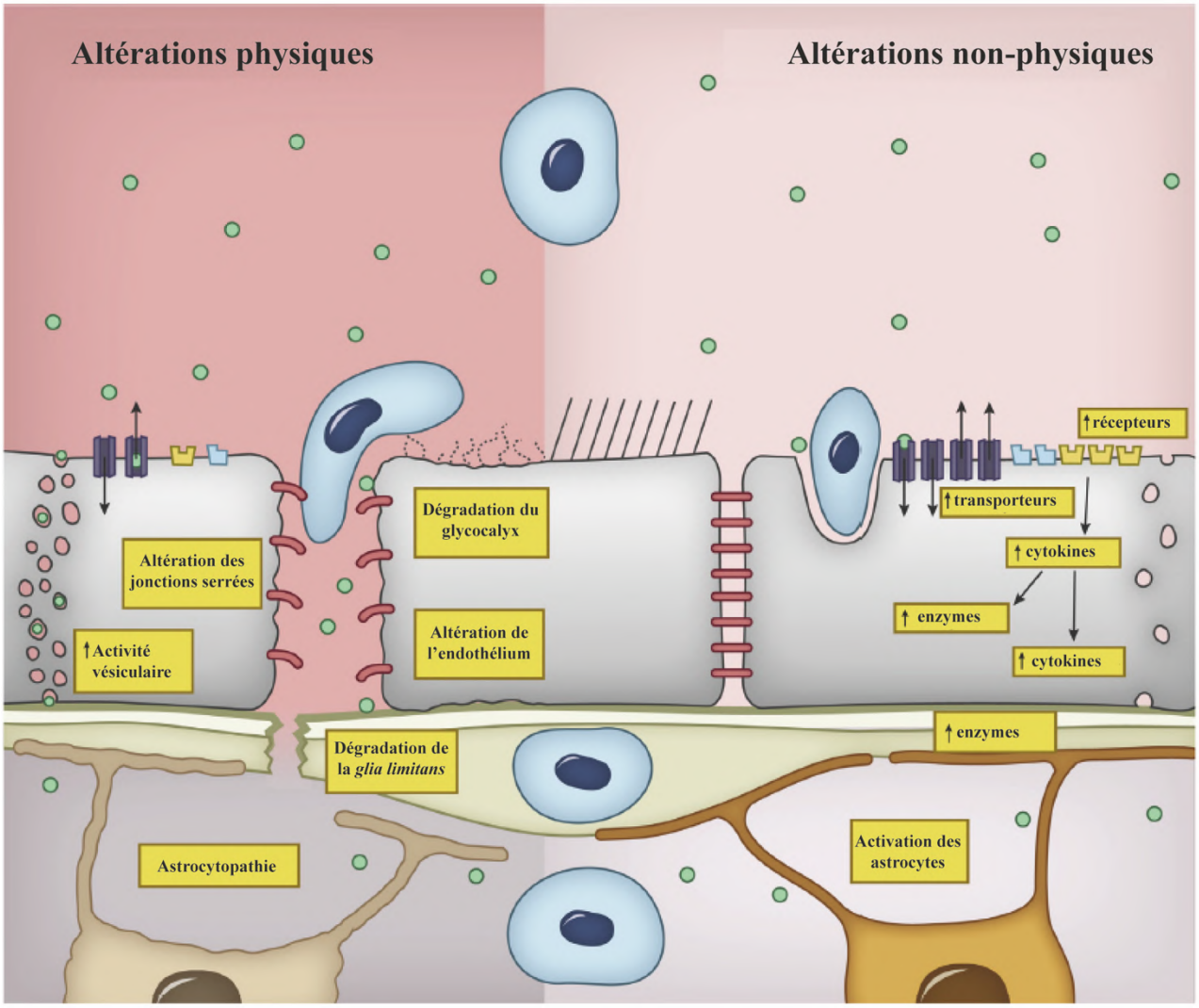


Figure 28 : Illustration schématique des changements physiques ou non physiques de la barrière hémato-encéphalique durant l'inflammation systémique.
Au cours d'une inflammation systémique, les médiateurs inflammatoires peuvent déclencher une inflammation également dans le SNC. Ces médiateurs peuvent altérer les fonctions de barrière imperméable de la BHE par des processus physiques ou non physiques, permettant l'invasion du SNC par des médiateurs inflammatoires. D'après Varatharaj, 2017.

Les altérations physiques se caractérisent par une dégradation des strates de la BHE, notamment des jonctions serrées des cellules endothéliales et de la *glia limitans*, et pouvant également être accompagnées de l'apoptose des cellules endothéliales. Cette rupture de la barrière facilite l'infiltration de cellules immunitaires circulantes et des facteurs solubles. Les altérations non-physiques consistent quant à elles à une activation des cellules endothéliales par des cytokines pro-inflammatoires induisant une augmentation du transport de ces cytokines vers le SNC. De plus, les cellules endothéliales activées vont produire et libérer de cytokines pro-inflammatoires en direction du parenchyme cérébral (Skelly *et al.*, 2013; Krasnow *et al.*, 2017). De fait, une neuroinflammation avec expression de cytokines pro-inflammatoires peut être observée suite à l'injection d'un PAMP bactérien en périphérie (Laye *et al.*, 1994). Plus généralement, dans certains cas, l'inflammation systémique peut induire une neuroinflammation. La neuroinflammation peut être provoquée lors de pathologies en périphérie, associées à une inflammation, comme des infections virales (Yamato & Kataoka, 2015) ou des maladies métaboliques telles que le diabète ou l'obésité (Van Dyken & Lacoste, 2018). D'autres maladies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques sont associées à une neuroinflammation (Saijo & Glass, 2011). Mais, il n'est pas encore très bien caractérisé si ces maladies sont la cause de la neuroinflammation ou la conséquence, autrement dit, c'est le problème de « la poule et de l'œuf ». Cependant, même si ces maladies affectent principalement le SNC, il est retrouvé des niveaux anormalement élevés de cytokines pro-inflammatoires dans le SNC mais aussi en périphérie (Blum-Degena *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2016; Italiani *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018).

Enfin, le vieillissement est aussi associé à la neuroinflammation et plus globalement de l'inflammation en général (Di Benedetto *et al.*, 2017). En effet, le vieillissement s'accompagne d'une diminution de l'efficacité du système immunitaire dans la résolution d'une inflammation suite à une infection ou un choc. Il est également observé l'accumulation des dommages subis par l'organisme au cours de sa vie, ainsi que, la senescence cellulaire. L'ensemble de ces déficiences crée ainsi un environnement pro-inflammatoire qui augmente avec l'âge sans se résoudre, d'où la notion d'*inflammaging*.

Ainsi, bien qu'il existe un dialogue contrôlé mais présent entre le SNC et la périphérie, le SNC ne se repose pas sur le système immunitaire périphérique en première intention pour lutter contre une condition pathologique. Dans la suite de ce chapitre je vous présenterai les différents acteurs de la neuroinflammation.

1.2. *Les acteurs locaux de la neuroinflammation*

Une fois mise de côté l'implication des cellules immunitaires périphériques qui peuvent dans certains cas infiltrer le SNC, la majorité des mécanismes de la neuroinflammation implique des cellules résidentes dont les cellules microgliales. La microglie va dialoguer avec les autres partenaires cellulaires du SNC que sont les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes grâce à la sécrétion de médiateurs solubles et d'interactions cellulaires.

1.2.1. La microglie

Les cellules microgliales sont considérées comme les principales cellules immunitaires résidentes du cerveau et sont qualifiées de « macrophages résidents du cerveau ». Elle représente 10 à 15 % des cellules du SNC et couvrent tout le territoire de ce dernier (Lawson *et al.*, 1992). La microglie diffère cependant de ses « cousins » les macrophages en termes d'origines lors du développement. En effet, contrairement aux macrophages, les cellules microgliales ne sont pas issues de la moelle hématopoïétique, mais du sac vitellin et ont colonisé le cerveau avant la formation de la BHE, très tôt dans le développement. Chez l'Homme, les cellules qui composent la microglie se renouvèlent très lentement, à hauteur de 28 % des cellules tous les ans et ont une longue durée de vie d'environ 4 ans (Réu *et al.*, 2017).

Ces cellules sentinelles du cerveau sont très dynamiques et ont un rôle aussi important en conditions physiologiques qu'en conditions pathologiques. Leur morphologie est également modifiée en fonction des conditions (Nimmerjahn *et al.*, 2005). En conditions physiologiques, les cellules microgliales sont des cellules ramifiées avec de multiples prolongements. Ces prolongements, très fins et très longs, émergent du soma pour explorer l'environnement et détecter d'éventuels troubles de l'homéostasie. Elles remplissent le rôle « d'éboueurs » du cerveau en éliminant les métabolites en excès ou les débris tissulaires par phagocytose. De plus, les cellules microgliales sont importantes pour la plasticité neuronale car elles jouent un rôle dans la réorganisation et le remodelage des circuits neuronaux en digérant par exemple la matrice extracellulaire, facilitant ainsi le développement de nouveaux prolongements (Tremblay *et al.*, 2011; Augusto-Oliveira *et al.*, 2019). Dans le même but, la sécrétion de BDNF par la microglie joue un rôle essentiel dans l'apprentissage et la mémorisation (Parkhurst *et al.*, 2013). Enfin, la microglie joue aussi un rôle essentiel dans la neurogenèse chez l'adulte par la sécrétion de neurotrophines et de cytokines anti-inflammatoires (Cope & Gould, 2019).

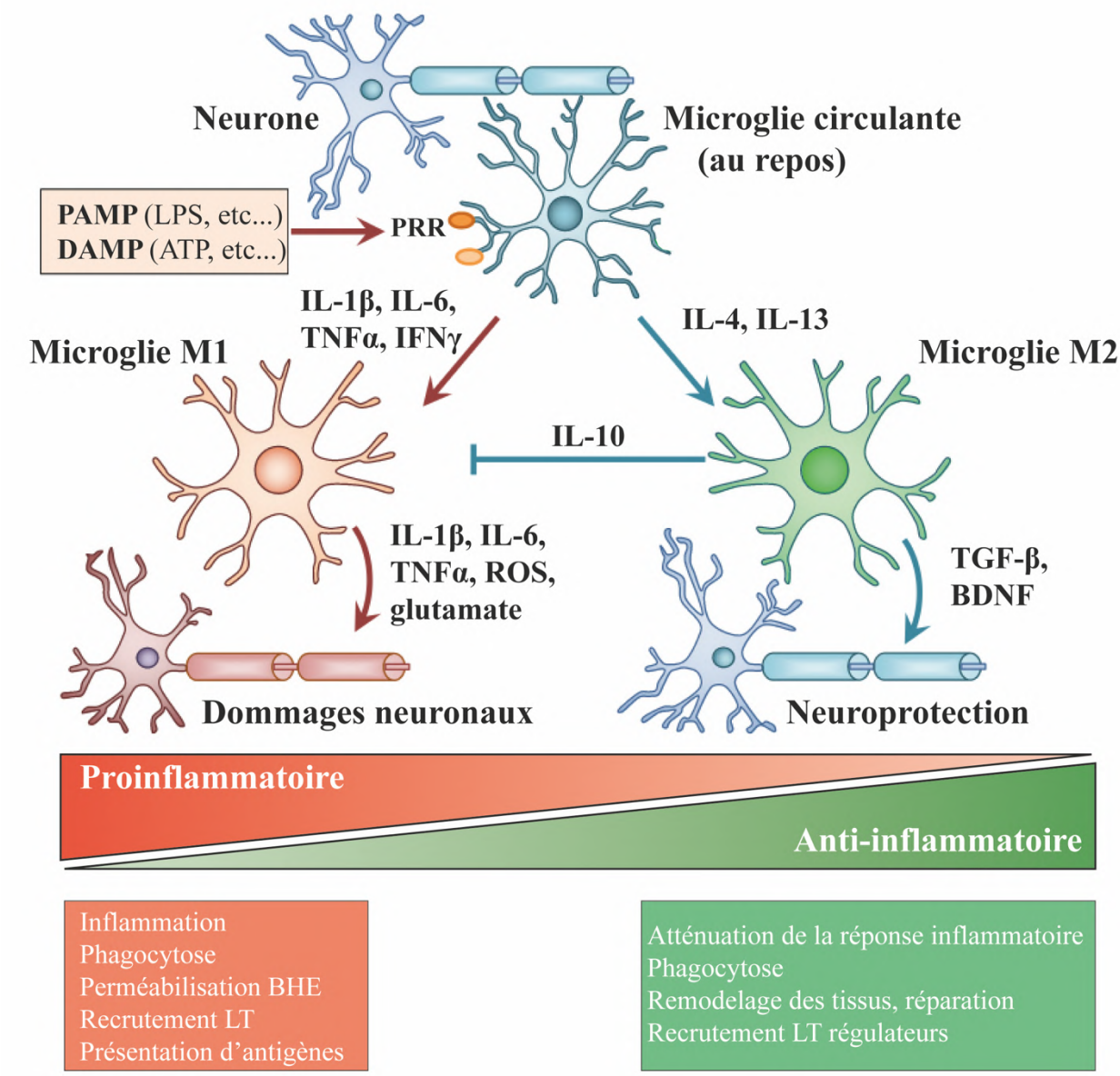


Figure 29 : Polarisation M1/M2 de la microglie et leurs fonctions immuno-régulatrices. Après la détection d'un signal de danger par la microglie, celle-ci est activée et se polarise selon deux profils aux fonctions opposées. La microglie M1, pro-inflammatoire, participe à l'élimination du danger mais peut induire des dommages aux neurones. La microglie M2, anti-inflammatoire, permet d'atténuer l'inflammation et de réparer les tissus pour limiter les dommages au cerveau. TGF-β = *transforming growth factor-β*. Adapté de Nakagawa, 2015 (Nakagawa & Chiba, 2015).

En conditions pathologiques, les cellules microgliales sont activées suite à la reconnaissance de PAMP ou de DAMP, à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou de chimiokines et à la stimulation de certains récepteurs aux neurotransmetteurs comme l'ATP (adénosine triphosphate) qui est libéré par des neurones endommagés (Al-Onaizi *et al.*, 2020). Les cellules microgliales activées présentent alors une morphologie amiboïde, adaptée à la division et au déplacement. L'ensemble des processus qui accompagnent l'activation de ces cellules microgliales s'appelle la microgliose. Le statut activé de la microglie oscille entre deux états, dépendants des stimuli : un profil d'activation classique pro-inflammatoire (cellule microgliale M1) et un profil d'activation alternatif anti-inflammatoire et réparateur (cellule microgliale M2) (Boche *et al.*, 2013). Les cellules M1 vont avoir pour rôle d'éliminer la menace par phagocytose et de présenter les antigènes aux LT qui pourraient s'infiltrer si la BHE est altérée. Les cellules M2 vont avoir des fonctions similaires aux cellules microgliales non activées et vont en plus favoriser la production et le remodelage de la matrice extracellulaire, inhiber l'inflammation ou éliminer les cellules mortes. Chacun des deux profils de microglie va sécréter un panel de facteurs solubles, propre à leur profil, dont des cytokines pro- (IL-1β, IL-6, TNFα) ou anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β (*transforming growth factor β*)) permettant une réponse adaptée à la situation (Figure 29).

Ainsi, la microglie se présente comme le pilier de la réponse inflammatoire du cerveau, grâce à ses multiples fonctions et à sa flexibilité dans l'expression et la sécrétion de facteurs adaptés aux différentes conditions. Malgré son grand dynamisme, la microglie est capable d'interagir physiquement avec tous les autres acteurs cellulaires du cerveau en servant de guide ou de support. Ces autres acteurs que sont les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes assistent et accompagnent la microglie, ou répondent à ses signaux lors du développement de la neuroinflammation.

1.2.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC puisqu'ils représentent 70 % des cellules cérébrales. Ils bénéficient d'une localisation très stratégique entre leurs contacts avec les cellules du SNC et les vaisseaux sanguins, en prenant part à la BHE. Ces cellules ont avant tout un rôle dans l'homéostasie du SNC, dans le métabolisme neuronal et dans la modulation dynamique de la transmission synaptique, comme j'ai pu le décrire dans le premier chapitre. Dans le cadre de la neuroinflammation, les astrocytes ont les mêmes capacités que la

microglie de changement d'un état au repos à un état activé, accompagné d'un changement de morphologie. Les astrocytes deviennent hypertrophiques et prolifèrent en réponse à l'activation, processus appelé l'astrogliose. De façon générale, une fois activés, les astrocytes remplissent les mêmes fonctions que les cellules microgliales mais avec un éventail de réponses plus restreint. Aussi, contrairement aux cellules microgliales qui sont plutôt mobiles et atteignent de vastes territoires grâce à leurs prolongements, les astrocytes sont des cellules qui ne bougent pas et qui restent confinés à leur environnement proche. Les astrocytes sont ainsi capables de sécréter quelques cytokines pro- (IL-1β, IL-6, TNFα) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β), mais aussi une plus grande variété de facteurs neurotrophiques que les cellules microgliales (Renaud *et al.*, 2015). Enfin, un des rôles essentiel et propre aux astrocytes est leur capacité à moduler la perméabilité de la BHE en favorisant le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires périphériques (Farina *et al.*, 2007).

1.2.2. Les neurones et les oligodendrocytes : un rôle immunomodulateur

Les oligodendrocytes sont des cellules de soutien, dont les prolongements entourent les fibres nerveuses pour former la gaine de myéline, favorisant ainsi la transmission de l'information électrique. Les neurones et les oligodendrocytes peuvent détecter la présence d'un danger mais leur panel de signalisation est plus limité que pour les astrocytes et la microglie. Ces deux types cellulaires ont un rôle majoritairement immunomodulateur. En effet, ces cellules expriment de façon constitutive des molécules anti-inflammatoires, telles que le TGF-β ou la fractalkine, qui permettent de maintenir la microglie à l'état de repos (Paolicelli *et al.*, 2014). Cet environnement immunosuppresseur permet ainsi de contenir les débordements des cellules de la microglie qui ont un arsenal pro-inflammatoire très important. Cela va plus largement tempérer la réponse inflammatoire, en contrebalançant la sécrétion de médiateurs qui pourraient être trop délétères pour l'intégrité du tissu. De plus, ces cellules expriment les récepteurs aux facteurs libérés par la microglie et les astrocytes, les rendant sensibles à la signalisation induite par ces facteurs (Renaud *et al.*, 2015).

Ainsi la neuroinflammation implique toutes les cellules résidentes du SNC qui dialoguent par des contacts et *via* la sécrétion de facteurs solubles. L'ensemble de ces facteurs compose une balance entre pro- et anti-inflammation. Dans un cerveau sain, il y a un équilibre entre signaux pro- et anti-inflammatoires. En conditions pathologiques, la neuroinflammation se

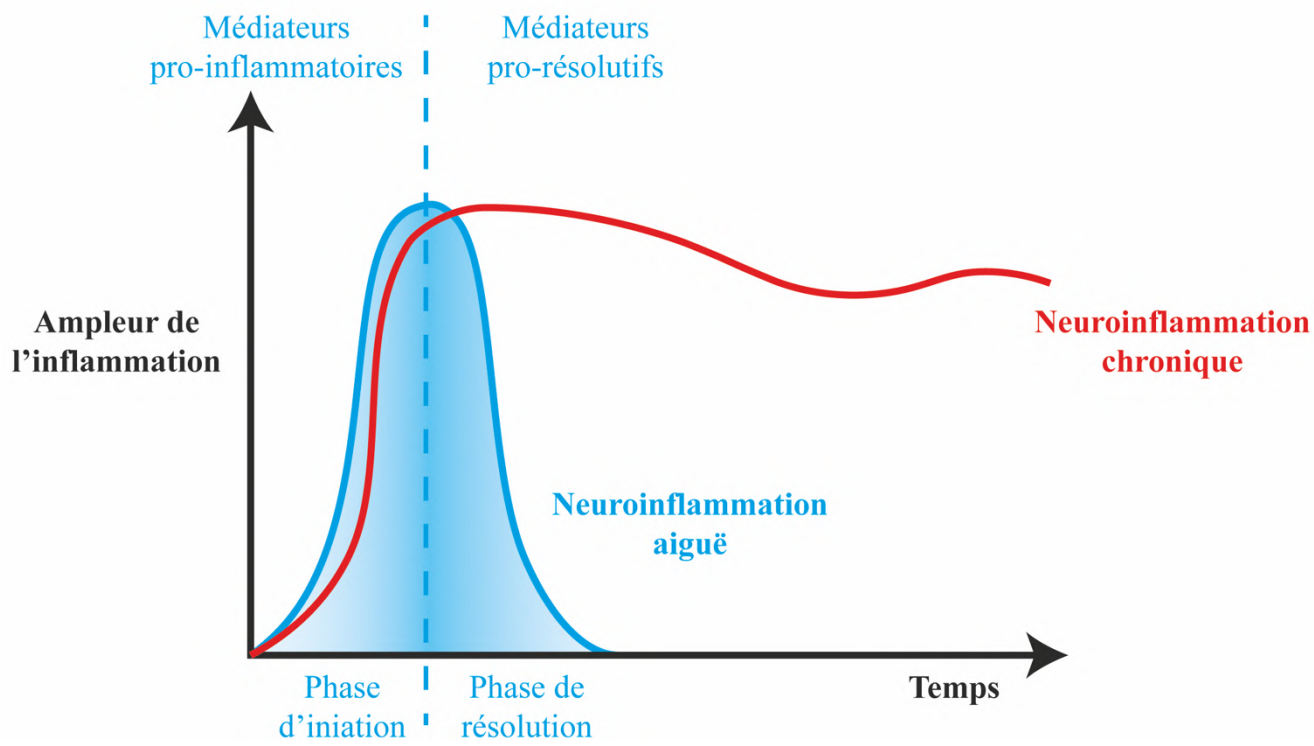


Figure 30 : Dynamique de la réponse neuroinflammatoire, de la neuroinflammation aiguë à la neuroinflammation chronique.
La neuroinflammation aiguë est une séquence d'évènements, coordonnée par de nombreux facteurs qui, en conditions physiologiques, est suivie d'une phase de résolution. En cas de défaut des voies de résolution, l'action des médiateurs proinflammatoires perdure, conduisant à une neuroinflammation chronique délétère. Adapté de Barnig, 2019 (Barnig *et al.*, 2019).

caractérise alors par la rupture de cet équilibre. Les neurones, en étant les cibles des actions des astrocytes et de la microglie, se modifient en termes de fonctionnement, de réponse et parfois même de survie. Finalement, cela lie directement la neuroinflammation à des conséquences sur le comportement. Mais, même si la neuroinflammation a souvent été mise en évidence dans des troubles du comportement et de l'apprentissage, l'étude de sa contribution à la pathogenèse de ces troubles est un domaine émergent.

2. LA NEUROINFLAMMATION : IMPACT SUR LE COMPORTEMENT

La neuroinflammation peut être la conséquence d'une inflammation périphérique ou d'une situation pathogénique directement dans le SNC. Elle peut être aiguë et transitoire, favorable à une résolution rapide, ou aiguë et intense et entrainer la mort (encéphalite). L'inflammation peut devenir chronique et créer un environnement pro-inflammatoire potentiellement délétère pour les tissus cérébraux (Figure 30). La compréhension de l'impact de la neuroinflammation, quelle que soit son origine, sur le comportement, permet de mettre en place des modèles notamment pour étudier le potentiel thérapeutique de molécules.

2.1. *La neuroinflammation aiguë et le sickness behavior syndrome*

La neuroinflammation aiguë est une inflammation transitoire et contrôlée, qui fait intervenir l'activation des cellules gliales résidentes et la production de cytokines pro-inflammatoires avec, dans certains cas, l'infiltration de cellules immunitaires adaptatives périphériques (Ludlow *et al.,* 2016). Elle est induite en réponse à une infection du SNC, un traumatisme crânien ou une inflammation en périphérie, qui activent l'inflammation au niveau du SNC.

2.1.1. Le *sickness behavior syndrome*

Lorsqu'un individu attrape la grippe ou une gastro-entérite, des symptômes neurologiques communs aux deux maladies peuvent apparaitre, à savoir : des maux de tête, de la fatigue, la perte de l'appétit et parfois de la fièvre. Ces symptômes, non spécifiques de ces maladies, mais aussi assez éloignés des signes de l'atteinte des poumons et du tractus digestif (cibles de ces virus), découlent de l'impact de l'inflammation périphérique sur le cerveau. La neuroinflammation aiguë qui est induite par ces infections, déclenche une combinaison de

symptômes neurologiques comme symptômes « secondaires » de la maladie, et a été appelée le *sickness behavior syndrome* (SBS) (Jurgens *et al.*, 2012).

Les symptômes neurologiques déclenchés par des pathologies touchant les organes en périphérie ont été décrits il y a longtemps, mais c'est Benjamin Hart en 1988 qui donna le nom de SBS et un sens à ces symptômes (Hart, 1988). Il définit alors le SBS comme « une stratégie comportementale organisée et évoluée des animaux et des Hommes malades, pour faciliter le rôle de la fièvre afin combattre une infection virale ou bactérienne ». Ce syndrome a été associé presque exclusivement aux cytokines pro-inflammatoires et à leur impact sur les fonctions neuronales. Le SBS regroupe donc plusieurs altérations du comportement qui ont pour but de favoriser une résolution rapide de l'infection ou du traumatisme : léthargie, faiblesse, anxiété, malaise, apathie, incapacité à se concentrer, fatigue, perte d'appétit, hypersomnie, perte d'intérêt pour les activités sociales et fièvre (Dantzer, 2001). L'objectif des cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau est donc d'induire une forme d'inactivité pour recentrer toute l'énergie produite par l'organisme dans la lutte contre le pathogène. Le mécanisme évolutif sous-jacent de protection est, qu'un individu souffrant de SBS va limiter ses interactions et ses prises alimentaires pour éviter de contaminer ou d'être, à nouveau contaminé. En effet, dans un contexte naturel, un animal malade et anxieux se cachera pour passer inaperçu puisque ses capacités de fuite sont limitées. De plus, l'hypersomnie favorise la mise en place de la mémoire immunitaire, compte-tenu de ce qui est connu du rôle du sommeil dans l'immunité. En effet, les hormones produites durant les phases de sommeil favorisent la mise en place de l'immunité adaptative en renforçant la présentation d'antigènes aux LT (Besedovsky *et al.*, 2012).

2.1.1. Etudier le *sickness behavior syndrome* : modèles et tests comportementaux

Le développement de ces symptômes est retrouvé en induisant une réponse inflammatoire systémique par injection de PAMP comme le lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou le poly (I : C) (ARN bicaténaire synthétique immunostimulant mimant la présence de génome viral) dans des modèles de rongeurs (Cunningham *et al.*, 2007). De plus, des cytokines pro-inflammatoires recombinantes comme l'IL-1β, l'IL-6 ou le TNFα peuvent être injectées aux rongeurs pour étudier avec précision l'impact de chacun de ces médiateurs. Leur injection peut se faire par différentes voies en fonction de l'information recherchée. En effet, l'injection peut se faire par voie intra-péritonéale pour étudier le rôle de l'inflammation périphérique sur la neuroinflammation centrale, ou par voie intra-cérébroventriculaire pour étudier l'induction

directe d'une neuroinflammation centrale. Des animaux ayant reçu du LPS ou des cytokines pro-inflammatoires souffrent, très tôt, d'une perte de motivation associée à une diminution de la prise alimentaire, et ce indépendamment de la voie d'injection (Layé *et al.*, 2000; Elander *et al.*, 2007). De plus, le SBS se caractérise aussi par de l'anxiété et un syndrome dépressif. Le premier peut être évalué sur les rongeurs en utilisant **le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM : *elevated plus maze*)**. Brièvement, le dispositif se présente comme une plateforme surélevée à quatre bras. Deux bras sont fermés par une paroi opaque et deux bras sont ouverts. La souris est déposée au centre du dispositif, ses déplacements sont enregistrés et le temps passé dans chaque bras est déterminé à l'aide d'un logiciel de traçage. Les animaux peuvent choisir d'aller se cacher dans les bras fermés, rassurants, ou d'aller dans les bras ouverts, plus exposés mais permettant d'explorer l'environnement distal. Après quelques heures de traitement, des souris injectées intra-péritonéalement avec du LPS tendent à passer moins de temps dans les bras ouverts, que les souris non traitées, montrant que la neuroinflammation induite par le LPS diminue l'envie d'explorer des souris et les rend plus anxieuses (Sabedra Sousa *et al.*, 2019). Pour la dépression, le test de nage forcée permet d'évaluer l'étendue du comportement de résignation et d'abandon de l'instinct de survie des souris. Les animaux sont placés dans un cylindre rempli d'eau et le temps d'immobilité des souris est évalué. Plus une souris sera dépressive, moins elle essaiera de nager. C'est le cas des souris injectées avec du LPS qui restent plus longtemps immobiles dans l'eau que les souris non traitées (Sabedra Sousa *et al.*, 2019).

Le SBS, qui contient une composante dépressive, apparait quelques heures après le développement de l'inflammation et peut durer quelques jours.

Ainsi, la neuroinflammation aiguë est bien caractérisée et une majorité des intermédiaires a été identifiée. L'ensemble des modèles développés permet maintenant d'étudier finement l'impact d'agents thérapeutiques afin de favoriser la résolution de la neuroinflammation et limiter les symptômes associés à cette dernière (Dokalis & Prinz, 2019).

Mais, même si la neuroinflammation aiguë est plutôt considérée comme bénéfique et résolutive pour l'individu, la persistance de niveaux importants de cytokines pro-inflammatoires et le passage à la chronicité peuvent avoir des effets irréversibles, plus délétères sur les fonctions cognitives.

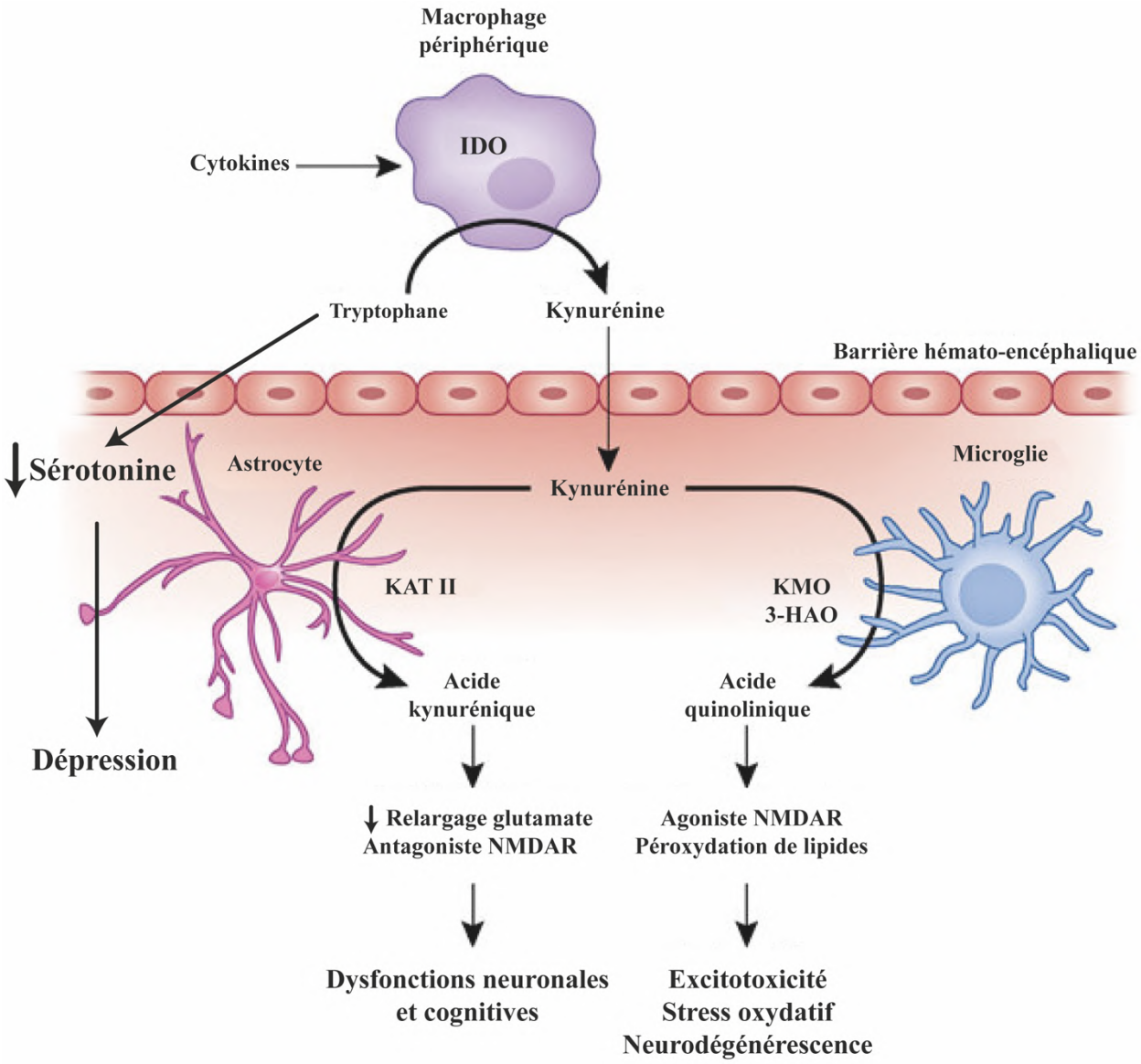


Figure 31 : L'enzyme IDO et la voie kynurénine dans la neuroinflammation chronique. L'enzyme IDO peut être activée dans les macrophages mais également dans la microglie activée. Son action de métaboliser le tryptophane a des conséquences délétères sur les fonctions neuronales et les fonctions cognitives. KATII = kynurénine-aminotransférase II ; KMO = kynurenine-3-monooxygénase ; 3-HAO = acide 3-hydroxyanthranilique oxydase. Adapté de Haroon, 2012 (Haroon *et al.*, 2012).

2.2. *La neuroinflammation chronique*

2.2.1. Du *sickness behavior syndrome* à la dépression

Le SBS est une réponse adaptative de l'hôte pour faire face à une infection ou un choc. Mais, que se passe-t-il lorsque le SBS, censé être aigu et transitoire, ne l'est plus et que la réponse dure dans le temps et/ou est disproportionnée par rapport à l'événement déclencheur ? C'est ce qui est retrouvé dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. En 1999, Raz Yirmiya est le premier psychobiologiste à faire l'analogie entre le SBS et la dépression, qui est une composante commune à presque toutes les maladies inflammatoires chroniques (Yirmiya *et al.*, 1999). En effet, ces deux syndromes ne peuvent pas être mis en parallèle même s'ils présentent les mêmes symptômes. D'un côté le SBS apparait comme de courte durée et globalement positif pour l'individu. D'un autre côté, la dépression s'installe dans le temps et engage des dysfonctionnements neuronaux plus ou moins irréversibles. Par exemple, lors du SBS, l'activité motrice chez la souris est rapidement récupérée après quelques jours, mais le caractère dépressif de résignation se résout plus tardivement que les autres symptômes (Frenois *et al.*, 2007). De plus, la dépression implique d'autres acteurs et impacte plus spécifiquement certaines régions du cerveau. En effet, la neuroinflammation chronique, *via* les cytokines pro-inflammatoires, induit l'expression et l'activation constante de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) de la voie kynurénine, dans les macrophages circulants ou les cellules microgliales activées. Cette activation de la voie kynurénine se fait plus précisément au niveau de l'hippocampe (Moreau *et al.*, 2008; André *et al.*, 2008). Cette enzyme a pour but de dégrader le tryptophane en kynurénine. La kynurénine peut ensuite être transformée par réactions enzymatiques en acide quinolinique. L'acide quinolinique est un agoniste des NMDAR et sa fixation peut provoquer une excitotoxicité pour les neurones. La kynurénine peut aussi être métabolisée en acide kynurénique qui est un antagoniste des NMDAR. En fonction des circonstances, cet effet peut être neuromodulateur et diminuer la surexcitation des neurones ou bien inhiber les neurones et conduire à des dysfonctions neuronales. Le tryptophane sert de précurseur pour la synthèse de la sérotonine, un neurotransmetteur important dont l'absence ou la faible quantité sont liés au développement de la dépression (Kraus *et al.*, 2017). Par conséquent, la diminution de la biodisponibilité du tryptophane, suite à sa dégradation par l'enzyme IDO, induit une diminution de la fabrication de la sérotonine et la production accrue de composés excitotoxiques (Figure 31) (Dantzer, 2009; Na *et al.*, 2014). Par exemple, l'induction d'une neuroinflammation chronique, par injection du Bacille de Calmette-Guérin

(BCG), a pour conséquence le développement d'un syndrome dépressif, caractérisé par l'augmentation de l'expression d'IDO. Les souris ont tendance à rester plus longtemps immobiles dans le test de nage forcée sans pour autant présenter les symptômes caractéristiques du SBS (perte d'appétit, perte de motricité) (Moreau *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2009). Également, la neuroinflammation chronique induite par l'obésité, en plus d'être souvent associée à un comportement anxieux, augmente la probabilité de développer une dépression suite à un stimulus immunitaire par l'activation de l'enzyme IDO (André *et al.*, 2014). Enfin, la dépression peut impliquer directement les cytokines et en particulier l'IL-1β. En effet, le syndrome dépressif observé chez les souris par une diminution de l'interaction sociale, suite à l'induction de stress pendant 5 semaines, est dépendant de l'IL-1β (Goshen *et al.*, 2008). Les mêmes résultats sont obtenus en mimant une inflammation chronique de plusieurs semaines par infusion systémique en continue d'IL-1β par l'intermédiaire d'un système de mini-pompe osmotique en sous-cutané.

Ainsi, la neuroinflammation aiguë peut évoluer en une forme chronique accompagnée de niveaux élevés de cytokines et d'un syndrome dépressif. La dépression est associée à une diminution du volume de l'hippocampe causée par une atrophie des neurones hippocampiques et une diminution de la neurogenèse (Boku *et al.*, 2018) A l'heure actuelle, il n'est toujours pas bien caractérisé qui, de la diminution du volume de l'hippocampe ou de la dépression est à l'origine de l'autre (Sheline, 2011). Ces troubles dans les structures hippocampiques pourraient expliquer également des troubles de la mémorisation et de l'apprentissage lors de la neuroinflammation chronique.

2.2.1. Neuroinflammation chronique et mémoire

Impact de la neuroinflammation chronique sur la mémoire

Beaucoup d'études ont établi le lien entre neuroinflammation chronique et perturbation des capacités de mémorisation. Cependant, l'étude des mécanismes sous-jacents est un domaine émergent de recherche, qui permet de mieux identifier les acteurs impliqués. Afin d'étudier l'impact de la neuroinflammation sur le comportement, des études ont proposé différents modèles afin de recréer une neuroinflammation chronique. Les capacités d'apprentissage et de mémorisation peuvent être testées en utilisant le test de la piscine de Morris mais aussi le test de ***novel place recognition*** **(NPR),** qui impliquent l'hippocampe (mémoire spatiale) et le test du ***novel object recognition*** **(NOR)** qui ne dépend pas seulement de l'hippocampe (mémoire de reconnaissance).

Brièvement, pour le test de la piscine de Morris, les souris sont disposées dans une piscine divisée en quatre quadrants dont un contient une plateforme juste en dessous du niveau de l'eau. La souris va alors nager pour trouver la plateforme pour « sortir » de l'eau. L'exercice consiste à évaluer, sur plusieurs sessions d'essais réparties sur plusieurs jours, le temps mis par la souris pour atteindre la plateforme. Cela permet ainsi d'évaluer son apprentissage de la position de la plateforme en se repérant dans l'espace. Avec l'apprentissage, le délai pour atteindre la plateforme se réduit chez la souris saine. Le principe des tests NPR et NOR consiste à placer le rongeur dans une arène contenant deux objets identiques et de laisser le rongeur explorer plusieurs minutes. Une deuxième session est réalisée quelques heures (NPR) ou une journée (NOR) plus tard et dans le cas du test NPR, un des objets a été déplacé alors que dans le cas du test NOR, un des objets est remplacé par un autre complètement différent. Ces tests reposent sur une préférence pour la nouveauté et la capacité d'exploration naturelle des rongeurs. Le temps passé avec chaque objet lors de la deuxième session est chronométré et le rongeur sain aura tendance à passer plus de temps avec la nouveauté : l'objet déplacé ou changé. Ainsi, quelques heures entre les deux sessions pour le NPR suffisent à impliquer seulement la consolidation de la mémoire spatiale qui se limite à la fonction de l'hippocampe. Au contraire, une journée entre les deux sessions implique le stockage de la mémoire et la sollicitation de plusieurs régions du cerveau dont le cortex (Denninger *et al.*, 2018).

Dans une étude, du LPS a été administré chroniquement dans le cerveau de rats grâce à une mini-pompe implantée en sous-cutané. La mini-pompe est ici reliée à une canule qui permet l'infusion directement dans le quatrième ventricule du cerveau. Ce dispositif garantit la diffusion d'une concentration précise d'une molécule en continu, tous les jours, durant quatre semaines. Les rats ayant développé une neuroinflammation suite à l'injection de LPS présentent alors des défauts de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante (montrés grâce au test de la piscine de Morris et le test NPR), mais pas de la mémoire non hippocampo-dépendante (montré par le test NOR) (Belarbi *et al.*, 2011). De plus, les fonctions de l'hippocampe sont également altérées dans un modèle de neuroinflammation chronique, médié par une infection par le virus influenza A chez la souris (montré par le test de la piscine de Morris) (Hosseini *et al.*, 2018). Malheureusement, dans ces études, la stimulation de la sécrétion complexe de nombreuses cytokines par la stimulation LPS ou infectieuse, ne permet pas de déterminer le rôle prépondérant d'une signalisation cytokinique.

Des modèles de neuroinflammation chronique utilisant des stratégies de surexpression de la cytokine IL-1β, spécifiquement dans l'hippocampe, ont été mis en place pour étudier ses effets sur la mémoire. Les résultats obtenus suggèrent une altération de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe chez la souris (montré par le test de la piscine de Morris) (Moore *et al.*, 2009). Une autre étude utilisant une autre stratégie permettant la surexpression de l'IL-1β dans l'hippocampe ne révèle pas d'altération des résultats du test NPR mais des différences sont observées suite à un test de discrimination de motifs déplacés. Ce test impliquant aussi l'hippocampe, les auteurs ont donc également conclu que la surexpression chronique d'IL-1β perturbait la mémoire hippocampo-dépendante (Hueston *et al.*, 2018). Cependant, la surexpression de la cytokine dépasse largement les quantités pathologiques observées lors de la neuroinflammation chronique et impliquent une perte de population de la niche neurogénique. Ces résultats révèlent donc la difficulté de mettre en place un modèle pertinent et reproductible. Les conséquences d'une neuroinflammation chronique sur la mémoire dépendraient à la fois du choix de l'inducteur, de son mode de diffusion et de l'espèce utilisée.

Aussi, comme je l'ai décrit plus haut, l'obésité est associée à une neuroinflammation chronique. Des travaux ont donc permis d'étudier l'implication de la neuroinflammation induite sur les troubles du comportement observé dans cette maladie. Dans un modèle de souris, rendues obèses à la suite d'un régime riche en lipides, une étude a montré, en utilisant le test NPR, que la neuroinflammation induite est associée à une perte de la mémoire hippocampo-dépendante après 4 semaines de régime gras (Del Rio *et al.*, 2016).

Le vieillissement est aussi accompagné d'une neuroinflammation chronique et la production de cytokines pro-inflammatoires. Des souris jeunes et des souris âgées ont été soumises aux tests NPR et NOR, et les souris âgées ont présenté des défauts de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe seulement (Labrousse *et al.*, 2012). La production d'Aβ, qui conduit à la maladie d'Alzheimer, est également associée à la neuroinflammation durant le vieillissement, l'un entrainant la production de l'autre et *vice versa* (Minter *et al.*, 2016). Afin d'analyser le rôle de l'Aβ dans le développement des troubles mnésiques observés durant le développement de la maladie d'Alzheimer, du peptide Aβ a été administré à des jeunes rats. Ceux-ci ont alors développé des troubles de la mémoire hippocampo-dépendante, avec des performances fortement diminuées pour le test de la piscine de Morris (Lesné *et al.*, 2006).

Ainsi, la neuroinflammation chronique est associée à des troubles de la mémoire mais les mécanismes moléculaires conduisant à ces troubles ne sont encore pas très bien caractérisés. Cette neuroinflammation déclenche un panel de symptômes et de perturbations qui évoluent en fonction de l'intensité et de la durée de celle-ci. Les différentes études ont mis en avant que, parmi les facteurs de la neuroinflammation, la présence d'IL-1β suffisait à reproduire certains troubles comportementaux. En revanche les mécanismes sous-jacents de l'effet de l'IL-1β chronique sur le fonctionnement neuronal et conduisant à des troubles de la mémoire restent peu explorés.

3. L'INTERLEUKINE-1β DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Les troubles du comportement observés durant la neuroinflammation ont été associés à la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines peuvent être produites et libérées par des cellules résidentes du SNC comme la microglie ou les astrocytes, mais également par des LT infiltrants. Comme indiqué précédemment dans ce chapitre, des cytokines pro-inflammatoires issues d'une inflammation en périphérie, peuvent également franchir la BHE et atteindre le SNC afin d'activer les cellules gliales. Au départ, uniquement associées à la neuroinflammation et donc à des conditions pathologiques, les cytokines pro-inflammatoires remplissent aussi un rôle dans le développement et la plasticité neuronale. L'impact des cytokines sur la physiologie neuronale a donc été largement étudié que ce soit en conditions physiologiques ou en conditions pathologiques.

Les principales cytokines pro-inflammatoires détectées dans la neuroinflammation sont l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα. L'IL-1β reste la cytokine la plus étudiée dans le cadre de la neuroinflammation et plus particulièrement son impact dans les maladies neurologiques et les troubles de l'apprentissage.

Dans la suite du chapitre, je présenterai les fonctions connues que remplit l'IL-1β en conditions physiologique et pathologique sur la plasticité et les fonctions neuronales.

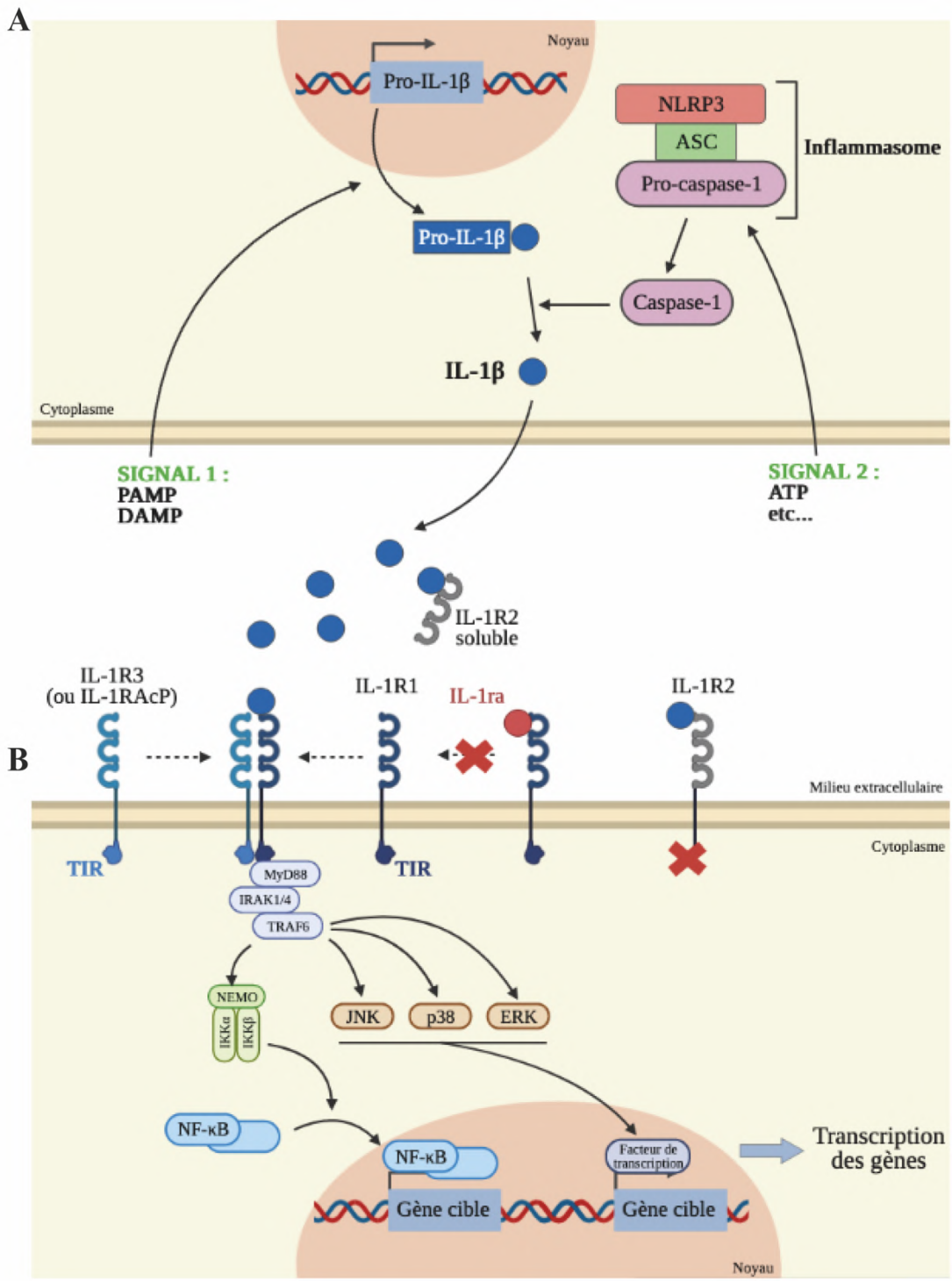


Figure 32 : Voies de signalisation de l'IL-1β.
(A) En réponse au signal 1 (PAMP et DAMP), la cellule transcrit la forme immature de l'IL-1β : la forme pro-IL-1β. En réponse au signal 2 (ATP, etc…), la caspase 1 est recrutée et activée par l'inflammasome NLRP3 pour cliver le forme pro-IL-1β et générer la forme mature de l'IL-1β qui est ensuite libérée. **(B)** L'IL-1β peut se fixer à son récepteur IL-1R1, qui en se couplant avec le co-récepteur IL-1R3 va activer des voies de signalisation permettant l'expression de gènes cibles. L'IL-1β peut aussi se fixer au récepteur IL-1R2 sous sa forme soluble libre ou ancrée à la membrane mais cela ne déclenchera pas de signalisation. L'antagoniste IL-1ra peut se fixer sur le récepteur IL-1R1 et entrer en compétition avec l'IL-1β. Adapté de Murray, 2015 (Murray *et al.*, 2015).

3.1. *Généralités*

3.1.1. La famille des interleukines-1

La famille des IL-1 est une grande famille composée maintenant de onze membres, qui sont codés par des gènes différents. Les trois principaux membres sont parmi les premiers à avoir été découverts et caractérisés : deux agonistes, IL-1α et IL-1β, et un antagoniste naturel IL-1ra (*IL-1 receptor antagonist*) (Dinarello, 2018). Les deux agonistes présentent beaucoup de similitudes dans leur production et leur mode d'action mais pour la suite nous développerons ce qui est connu pour l'IL-1β.

La production et la libération d'IL-1β fait intervenir deux signaux inducteurs. D'abord, l'IL-1β est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 33 kDa (pro-IL-1β). A l'état basal, la cytokine pro-IL-1β est constitutivement exprimée mais à des niveaux très faibles. Mais, la détection de PAMP ou de DAMP par la cellule *via* les PRR, active de façon efficace la transcription et la traduction, *via* la voie NF-κB, du précurseur pro-IL-1β. Dans un deuxième temps, l'inflammasome NLRP3 est assemblé afin de convertir la caspase-1 en sa forme active qui va cliver le précurseur pro-IL-1β en IL-1β mature (17 kDa) qui sera ensuite sécrétée hors de la cellule. Les mécanismes qui constituent ce deuxième signal font intervenir des signaux de danger à l'extérieur de la cellule comme par exemple la liaison d'ATP (considéré aussi comme un DAMP) à son récepteur (signal 2) (Murao *et al.*, 2021) (Figure 32A). Cependant, les modalités de libération de la cytokine ne sont pas encore bien caractérisées. De façon intéressante, l'IL-1β peut aussi amplifier sa propre production sans passer par l'activation des PRR. L'IL-1β peut se fixer sur son récepteur IL-1R1 (*IL-1β receptor type 1*) à la surface des cellules cibles. La liaison permet le recrutement et la liaison du co-récepteur IL-1R3 (anciennement appelé IL-1RAcP (*IL-1β receptor accessory protein*)) à IL-1R1. Les deux protéines disposent de domaines intracellulaires TIR (*Toll-interleukin receptor*) qui, une fois rapprochés, recrutent la protéine MyD88 qui va déclencher une cascade de kinases activant majoritairement la voie NF-κB ou sinon les voies MAPK (ERK, JNK, p38). Selon la voie activée, la signalisation de l'IL-1β sur son récepteur permet d'induire la transcription d'interférons, de cytokines amplifiant en conséquence la réponse inflammatoire (Figure 32B) (Weber *et al.*, 2010; Dinarello, 2018).

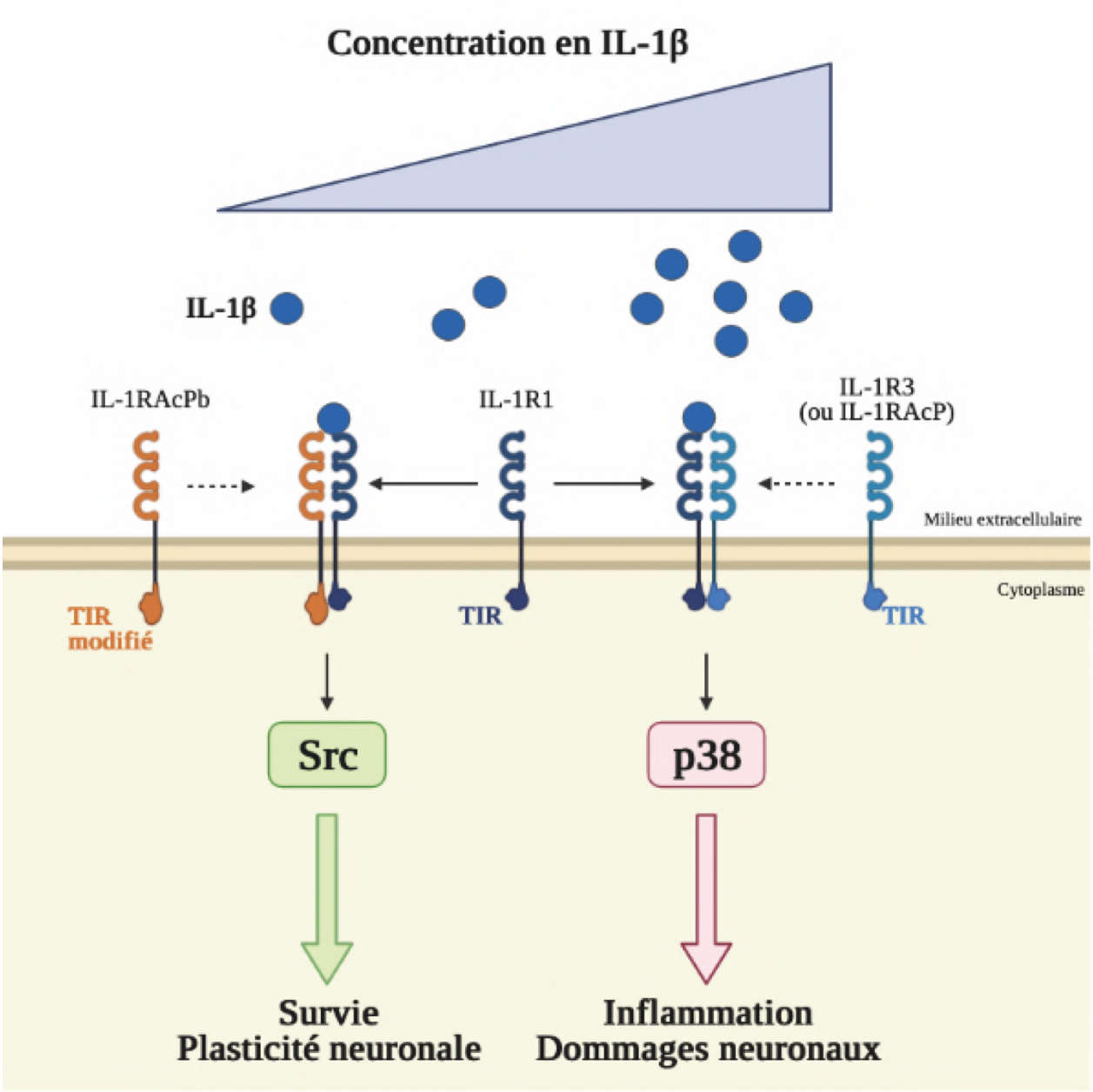


Figure 33 : Organisation des récepteurs IL-1R neuronaux et des différentes voies de signalisation engagées.
A faibles concentrations, l'IL-1β a pour corécepteur IL-1RAcPb et peut déclencher une voie de signalisation dépendante de Src ayant des conséquences bénéfiques pour les neurones. Au contraire, à fortes concentrations, l'IL-1β a pour corécepteur IL-1R3 qui déclenche une cascade de signalisation impliquant p38 et ayant des conséquences délétères pour les neurones. Adapté de Prieto, 2015.

Deux régulateurs existent de façon naturelle afin de limiter une trop forte signalisation de l'IL-1β, qui serait délétère. D'abord l'antagoniste IL-1ra qui est capable d'entrer en compétition avec l'IL-1β pour la fixation sur le récepteur IL-1R1. Une quantité très supérieure à la quantité d'IL-1β est cependant nécessaire pour observer un blocage de la signalisation. Aussi, il existe un récepteur dit récepteur « leurre » l'IL-1R2, capable de lier l'IL-1β mais qui ne dispose pas du domaine intracellulaire TIR. De ce fait, la formation du complexe IL-1β/IL-1R1/IL-1R2 n'induira pas de cascades de signalisation en aval (Dinarello, 2011). Ce même récepteur « leurre » existe aussi sous-forme soluble sécrétée, permettant de capter l'IL-1β et réguler les quantités de cytokines dans le milieu extracellulaire afin de moduler le déclenchement d'une voie de signalisation.

3.1.2. L'IL-1β et ses récepteurs dans le cerveau

Tous les membres de la famille des IL-1 sont exprimés dans le cerveau sain et des niveaux faibles d'IL-1β sont détectés, avec une expression plus marquée au niveau du système limbique. Toutes les cellules du SNC sont capables de synthétiser de l'IL-1β mais les cellules spécialisées comme la microglie et les astrocytes sont les producteurs majoritaires (Fogal & Hewett, 2008).

Le récepteur et le co-récepteur de l'IL-1β sont également exprimés dans tout le cerveau mais principalement au niveau de l'hippocampe (Farrar *et al.*, 1987; Fogal & Hewett, 2008). Par contre le récepteur IL-1R2 n'est pas détecté au niveau encéphalique. Toutes les cellules expriment les récepteurs à l'IL-1β, mais à des niveaux variables en fonction des régions et des conditions. Les neurones hippocampiques expriment constitutivement le récepteur, tandis que les cellules gliales ont besoin d'un stimulus inflammatoire pour exprimer fortement le récepteur. Le même stimulus induit aussi une augmentation de l'expression du récepteur IL-1R1 par les neurones (Friedman, 2001). Concernant le co-récepteur IL-1R3, les neurones l'expriment à des niveaux très faibles contrairement aux astrocytes qui l'expriment fortement. En revanche, dans l'hippocampe, seulement les neurones expriment une autre isoforme du co-récepteur IL-1R3 : l'IL1RAcPb, qui leur permet d'induire une réponse unique à l'IL-1β (Smith *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011). L'implication de l'un ou l'autre des co-récepteurs dans la signalisation de l'IL-1β dépend de la concentration en IL-1β et ne déclenchent pas l'activation des mêmes voies de signalisation (Figure 33) (Huang *et al.*, 2011). De façon intéressante, contrairement aux astrocytes, les neurones stimulés par l'IL-1β n'induisent pas une cascade de signalisation qui dépend de la voie classique NF-κB (Srinivasan *et al.*, 2004). A faible concentration, l'IL-1β active des voies dépendantes de la phosphorylation de la tyrosine kinase

Src *via* sa liaison au récepteur IL-1RAcPb, alors qu'à plus forte concentration, l'IL-1β active des voies dépendantes de la phosphorylation telles que la voie p38/MAPK *via* le co-récepteur conventionnel IL-1R3 (Huang *et al.*, 2011). Cette double induction du signal implique des fonctions et des conséquences différentes de la signalisation en fonction de la concentration d'IL-1β. Ainsi, la signalisation induite *via* le co-récepteur conventionnel IL-1R3 est mise en jeu principalement dans les processus de l'inflammation et des dommages neuronaux alors que le co-récepteur IL-1RAcPb a plutôt un rôle trophique en favorisant la survie des neurones et la plasticité neuronale (Figure 9) (Smith *et al.*, 2009; Gosselin *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 2015). De fait, une augmentation du ratio IL-1R3/IL-1RAcPb, associée au vieillissement, semble également être impliquée dans l'augmentation de la vulnérabilité des neurones à l'IL-1β (Prieto *et al.*, 2015).

Enfin, les niveaux d'expression du récepteur IL-1R1 apparaissent enrichis à l'intérieur des compartiments post-synaptiques. Cette localisation des récepteurs est associée à une interaction moléculaire entre le récepteur IL-1R1 et une des sous-unités des récepteurs NMDAR : le GluN2B, et cette association est amplifiée lorsque les neurones sont traités avec du NMDA (Gardoni *et al.*, 2011). Aussi le traitement à l'IL-1β ou au NMDA induit une augmentation de la présence des IL-1R1 au niveau des zones post-synaptiques. Ces résultats suggèrent donc qu'un rapprochement entre l'IL-1R1 et le NMDAR pourrait avoir lieu durant la neuroinflammation et participer à sa mise en place. Aussi, ces résultats suggèrent que la signalisation par l'IL-1β pourrait moduler les fonctions des NMDAR.

Cependant, tous ces mécanismes ont été mis en évidence sur des cultures de neurones *in vitro* ou sur des coupes d'hippocampes traitées avec de l'IL-1β en aigu.

De nouveaux modèles ont alors émergé permettant d'étudier la signalisation de l'IL-1β dans le cerveau. En effet, des modèles de souris déficientes pour le récepteur IL-1R1, spécifiquement dans certaines cellules du SNC, ont permis de mettre en évidence les fonctions de cette signalisation en fonction du type cellulaire (Liu *et al.*, 2019; Pinteaux *et al.*, 2020). Ces modèles et ces approches représentent donc une opportunité très intéressante pour étudier avec précision l'impact de la signalisation de l'IL-1β sur des mécanismes précis. Même si ce déficit constitutif en IL-1R1 peut avoir un impact sur la maturation des régions du SNC impliquées et/ou mettre en jeu des mécanismes compensatoires.

Ainsi, l'IL-1β a un rôle très particulier dans le SNC du fait des nombreuses caractéristiques exclusives de sa signalisation dans le SNC. Notamment, son expression, aussi bien que celle de son récepteur, très localisées au niveau du système limbique et plus particulièrement dans l'hippocampe, invite à penser que cette cytokine a un impact sur le fonctionnement de cette région. L'IL-1β est le prototype de la cytokine « multifonctionnelle ». Quel est son impact en conditions physiologiques ou pathologiques sur la plasticité neuronal ? Dans la section suivante, nous nous intéresserons aux fonctions que remplit l'IL-1β, qu'elles soient positives ou délétères pour les neurones.

3.2. *L'IL-1β, amie ou ennemie ?*

3.2.1. Les effets positifs de l'IL-1β

La majorité des recherches jusqu'à ces quinze dernières années étaient concentrées sur l'étude de l'IL-1β et des cytokines en général, dans la neurodégénérescence. Mais depuis, de nombreux travaux ont mis en évidence un rôle bénéfique de l'IL-1β dans le cerveau sain mais également dans le cerveau pathologique.

En conditions physiologiques

L'expression de ces protéines en conditions normales de fonctionnement, même à des niveaux très faibles, au niveau du système limbique, a suggéré que l'IL-1β pouvait avoir un rôle dans les processus neuronaux physiologiques lors de la mémorisation.

La stimulation électrique des neurones de l'hippocampe, *in vivo*, chez le rat suffit à induire une augmentation de l'expression de l'IL-1β par ces neurones et cette augmentation est réduite chez des rats âgés (Balschun *et al.*, 2003). Aussi, des souris soumises à des tests de mémoire spatiale ou d'apprentissage, voient leur niveau d'expression d'IL-1β augmenter spécifiquement dans l'hippocampe (Goshen *et al.*, 2007; Labrousse *et al.*, 2009). Dans le cas de souris dépourvue d'IL-1R1 ou surexprimant l'antagoniste IL-1ra, l'augmentation d'expression d'IL-1β est abrogée malgré un challenge par des tests d'apprentissage (Goshen *et al.*, 2007). Ces résultats ont mis en évidence que l'IL-1β et sa signalisation peuvent coexister avec la mémoire et l'apprentissage en conditions physiologiques. Dans ces mêmes modèles où la signalisation d'IL-1β est déficiente, les souris présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation spatiale ou contextuelle dans des tâches impliquant (Goshen *et al.*, 2007). De même, des souris déficientes pour un récepteur à l'ATP, impliqué dans la sécrétion de

l'IL-1β mature, présentent les mêmes troubles dans des tâches de mémorisation impliquant l'hippocampe (Labrousse *et al.*, 2009). Enfin, l'injection d'une faible dose d'IL-1β en intra-cérébroventriculaire conduit à une amélioration de la mémoire contextuelle, dépendante de l'hippocampe (Goshen *et al.*, 2007). L'effet bénéfique de l'IL-1β à faibles doses peut s'expliquer en partie par la capacité de la cytokine à induire une augmentation transitoire de l'excitation des neurones. En effet, l'IL-1β à faibles doses et en aigu peut augmenter l'influx de Ca^{2+} en ouvrant les canaux ioniques NMDAR par l'intermédiaire de la phosphorylation de Src. L'activation de cette voie, comme mentionné précédemment, participe à l'expression de facteurs trophiques, participant à la plasticité neuronale (Viviani *et al.*, 2003).

La production de ces faibles quantités d'IL-1β permet également de stimuler le relargage de neurotransmetteurs, ou la production de facteurs de neurotrophines qui participent à la plasticité neuronale (Bourgognon, 2020). En effet, la signalisation de l'IL-1β est liée à la production de c-Fos, un facteur de transcription précoce qui permet d'activer la transcription de neurotrophines telles que le BDNF (Labrousse *et al.*, 2009).

Ainsi la production d'IL-1β joue un rôle dans les mécanismes de mémorisation dépendants de l'hippocampe et joue un rôle important dans la plasticité neuronale en conditions physiologiques.

En conditions pathologiques

Même si la majorité des études suggèrent que l'IL-1β est délétère pour le SNC en conditions pathologiques, certaines mettent en évidence un rôle neuroprotecteur dépendant de la concentration de la cytokine et de la durée de la réponse par rapport à l'élément déclencheur (Fogal & Hewett, 2008). En conditions pathologiques, la neuroinflammation peut être aiguë, transitoire et résolutive (menant au SBS), ou chronique et délétère. L'IL-1β est libérée en grande partie par la microglie activée et participe aux mécanismes mis en place dans le SBS. Même si l'IL-1β ne semble pas participer directement à des mécanismes de neuroprotection, elle participe de concert avec tous les acteurs de la neuroinflammation aiguë au retour à l'homéostasie neuronale (Sochocka *et al.*, 2017). L'IL-1β, en permettant la prolifération et l'activation de la microglie, participe indirectement aux fonctions de « nettoyage » et de maintien de l'homéostasie cérébrale par les cellules microgliales (Monif *et al.*, 2016). Par ailleurs, comme j'ai pu le décrire précédemment, l'IL-1β participe au développement du SBS et des symptômes qui en découlent, montrant donc le rôle de la cytokine dans la mise en place des processus de protection et de réparation liés au SBS.

Un autre exemple de symptômes du SBS est la fatigue qui permet à l'individu de concentrer son énergie dans la lutte contre l'élément perturbateur. L'IL-1β est une des cytokines impliquées dans la régulation des cycles du sommeil en agissant sur la sécrétion de neurotransmetteurs favorisant le sommeil, comme la sérotonine (Imeri & Opp, 2009).

Finalement, l'IL-1β possède des effets bénéfiques pour le cerveau, que ce soit en conditions physiologiques, pour le maintien de la plasticité neuronale mais aussi lors du SBS pendant une neuroinflammation aiguë. Certains travaux supposent également qu'une expression contenue d'IL-1β par des astrocytes, après la lésion, pourrait intervenir dans les mécanismes de réparation et de régénération (Mason *et al.*, 2001). Mais l'impact de l'IL-1β et plus généralement de toutes les cytokines, varie en fonction de deux paramètres : la durée de la stimulation et l'intensité ou la concentration de la cytokine. Ainsi, l'augmentation du temps d'exposition à une cytokine ou une augmentation de la concentration de celle-ci joue un rôle délétère dans l'homéostasie neuronale.

3.2.2. Les effets négatifs de l'IL-1β

Effets délétères lors de la neuroinflammation aiguë

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliquant l'IL-1β, ayant des conséquences lors de maladies neurologiques aiguës de type ischémie cérébrale, lésion cérébrale traumatique, lésion de la moelle épinière ou associées au SBS, ne sont pas très bien caractérisés. Cependant, une des premières conséquences de ces troubles est l'augmentation de la production d'IL-1β dans le cerveau et plus particulièrement au niveau de la zone lésée (Fogal & Hewett, 2008). De plus, l'IL-1β joue un rôle essentiel dans le développement des symptômes observés durant le SBS. De ce fait, bloquer expérimentalement la voie de signalisation en aval de l'IL-1β en utilisant des anticorps neutralisants contre l'IL-1β, l'antagoniste IL-1ra ou des modèles IL-1R1 déficients, permet de diminuer les conséquences délétères dans ces troubles.

D'abord, l'IL-1β, issue de la périphérie ou du SNC, peut induire l'expression de gènes pro-inflammatoires, le sien compris, pour mettre en place les premières phases de la neuroinflammation (Thome *et al.*, 2020).

L'effet dose-dépendant de l'IL-1β est retrouvé *in vivo,* dans la même étude qui a montré qu'à faibles doses, l'IL-1β favorisait la mémoire contextuelle. En effet, des souris exposées à une concentration plus importante de cytokines vont cette fois présenter des troubles de la mémoire contextuelle (Goshen *et al.*, 2007).

Cela peut en partie s'expliquer par le fait que les voies activées par l'IL-1β, *in vitro*, sont différentes en fonction de la concentration et n'impliquent pas les mêmes co-récepteurs. A faibles doses, l'IL-1β active les récepteurs NMDAR et participe à la neuroplasticité, mais cela rend les neurones beaucoup plus sensibles à l'excitotoxicité ou à une condition pathologique. En effet, des neurones traités avec une faible dose d'IL-1β sont plus sensibles à l'excitotoxicité induite par une stimulation NMDA, car trop de récepteurs NMDAR seront activés (Viviani *et al.*, 2003). L'IL-1β n'est donc pas toxique en soit, lorsqu'elle est au contact des neurones mais elle accentue les conséquences de dommages liés à l'excitotoxicité (Hailer *et al.*, 2005). Ainsi, dans les neurones, le traitement conjoint par de l'IL-1β et du NMDA augmente l'interaction entre leurs récepteurs respectifs, ce qui entraine une amplification synergique des voies de signalisation sous-jacentes et de l'excitotoxicité (Gardoni *et al.*, 2011).

L'IL-1β peut aussi avoir un effet sur les astrocytes en diminuant l'expression à la surface de transporteurs du glutamate : GLT-1 (*glutamate transporter-1*) et GLAST (*glutamate aspartate transporter*) (Yan *et al.*, 2014). Il en résulte une diminution des capacités de recapture du glutamate dans le milieu extracellulaire, conduisant à des débordements du glutamate en dehors de la synapse, qui créent un stimulus excitotoxique pour les neurones. Dans des modèles de souris déficientes pour l'IL-1R1 dans les cellules endothéliales, il a été mis en évidence qu'un traitement par injection intra-cérébroventriculaire d'IL-1β n'active pas directement la microglie. En effet, cette activation se fait indirectement par l'intermédiaire de la signalisation IL-1R1 des cellules endothéliales (Liu *et al.*, 2019). Ces cellules endothéliales sécrètent à leur tour un autre facteur soluble, non déterminé, pour activer la microglie.

Ainsi, l'IL-1β produite durant la neuroinflammation aiguë peut très rapidement devenir délétère si la concentration en cytokine augmente et que le système s'auto-amplifie. Si l'équilibre de la réponse est rompu, alors des phénomènes de dérégulation de circuits plus complexes ont lieu, conduisant à des maladies neurologiques chroniques, voire à la neurodégénérescence.

Effets délétères lors de la neuroinflammation chronique

Dans un premier temps, l'IL-1β peut jouer un rôle dans la pathogenèse de la dépression, en interférant avec la voie de synthèse de la sérotonine. En effet, l'IL-1β peut induire l'expression de l'enzyme IDO et donc oriente la dégradation du tryptophane en augmentant la voie kynurénine (Zunszain *et al.*, 2012). Cela a plusieurs conséquences, dont l'augmentation d'acide quinolinique, excitotoxique pour le neurone et la diminution de la synthèse de sérotonine. De plus, l'activation de cette voie induit une diminution de la neurogenèse et de la différentiation de progéniteurs neuronaux en neurones matures (Zunszain *et al.*, 2012). Le même impact de l'IL-1β sur la neurogenèse, cette fois spécifiquement dans l'hippocampe, a également été observé dans un modèle d'infusion chronique d'IL-1β conduisant au développement d'une dépression chez les sujets (Goshen *et al.*, 2008). L'IL-1β peut aussi augmenter, *in vitro*, l'expression du transporteur de la sérotonine qui permet sa recapture (Zhu *et al.*, 2006). Cette dérégulation suggère que la cytokine peut augmenter la recapture de la sérotonine, et diminuer sa concentration dans le milieu extracellulaire.

La neuroinflammation chronique provoque également des troubles de la mémoire et de l'apprentissage qui peuvent être associés ou non à de la neurodégénérescence. En effet, dans les modèles de surexpression de l'IL-1β spécifiquement dans le cerveau, il est retrouvé que la neuroinflammation chronique conduit à l'infiltration de cellules immunitaires périphériques (LT et neutrophiles), et à une diminution de la neurogenèse sans neurodégénérescence associée (Shaftel, 2007 ; Moor, 2009 ; Hueston, 2018). L'amplification et la persistance des mécanismes délétères de la neuroinflammation aiguë, impliquant l'IL-1β, peuvent expliquer en partie l'évolution en neurodégénérescence. En effet, l'altération continue du système glutamatergique, amplifie l'excitotoxicité et conduit à la mort neuronale. En outre, l'IL-1β, en activant sa signalisation dépendante de la voie p38/MAPK, est impliquée dans la perturbation de la signalisation de la neurotrophine BDNF (Tong *et al.*, 2012). Une telle perturbation lors d'une neuroinflammation chronique conduit à une diminution de la plasticité neuronale et une régression des neurones. En effet, des altérations de longue durée de la signalisation du BDNF altèrent *in fine*, la croissance et le remodelage des neurones et donc le processus de plasticité neuronale avec des répercussions sur les fonctions d'apprentissage et de mémorisation. Des nouveaux modèles de souris ont émergés permettant d'étudier le rôle de la signalisation IL-1β spécifiquement dans des neurones glutamatergiques (excitateurs). En effet, dans ces souris, il a été possible d'induire la délétion du gène codant le récepteur IL-1R1 spécifiquement dans ce sous-type de neurones. Il a pu être mis en évidence que les perturbations de la mémoire de travail (mémoire à court terme), observées chez des souris stressées, étaient prévenues par la

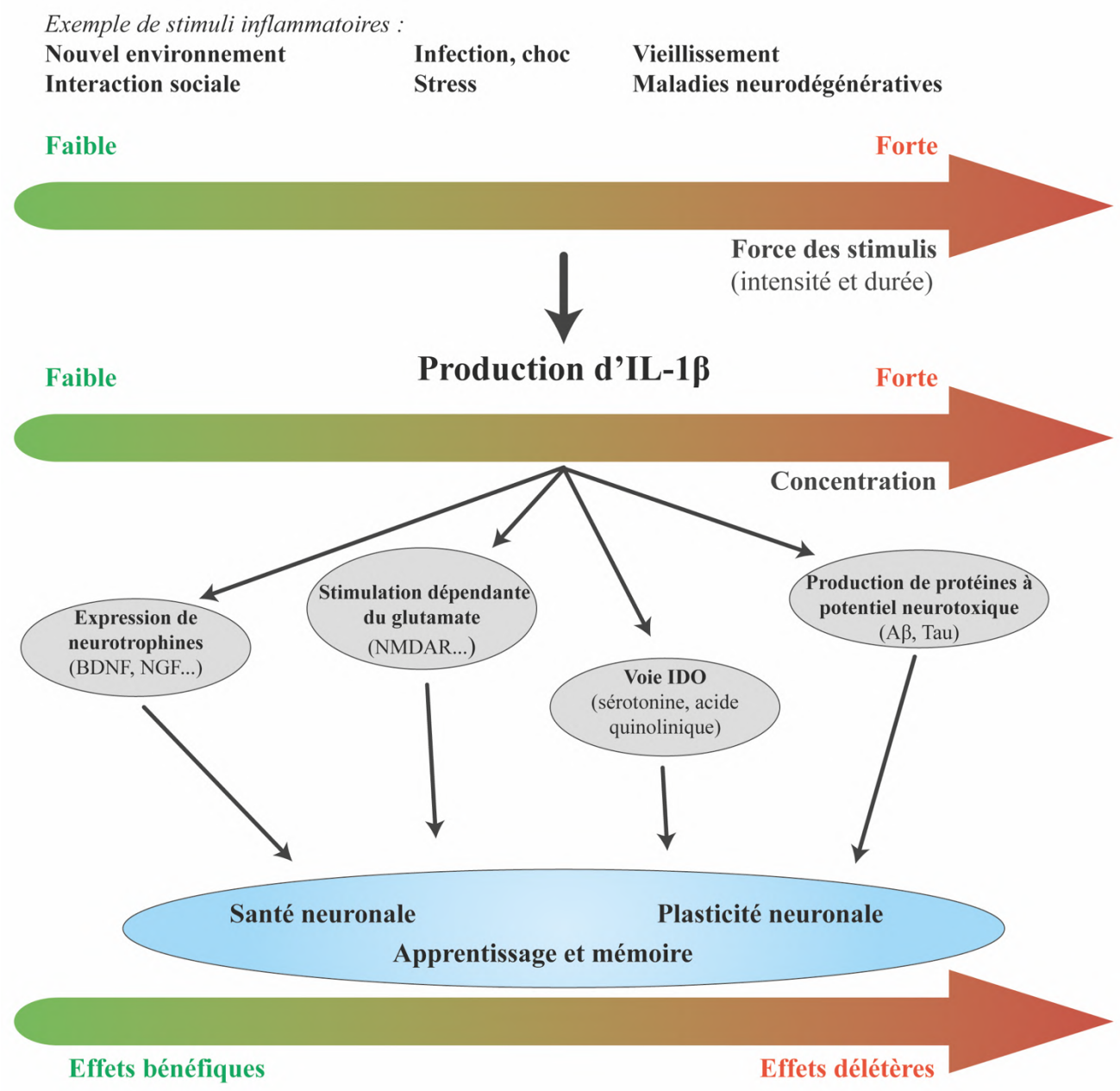


Figure 34 : Aperçu des mécanismes d'action majeurs de l'interleukine lL-1β sur la plasticité neuronale, la mémoire et l'apprentissage.
Les conséquences d'une stimulation par l'IL-1β dépendent de la force des stimuli inducteurs et de la concentration d'IL-1β produite. Les modifications de certains processus comme la stimulation dépendante du glutamate, peuvent être à la fois bénéfiquee ou délétèree pour les neurones en fonction des conditions. NGF = *nerve growth factor.* Adapté de Bourgognon, 2020 (Bourgognon & Cavanagh, 2020).

délétion du récepteur IL-1R1. Ainsi, les perturbations de la mémoire de travail font intervenir la signalisation à l'IL-1β dans les neurones exciteurs (DiSabato *et al.*, 2020).

Enfin, l'IL-1β est détectée très tôt dans certaines maladies neurodégénératives, et est associée aux conséquences neurologiques du vieillissement. En effet, l'IL-1β, produite par la microglie en concentration importante, active la voie p38/MAPK et peut conduire à la phosphorylation de la protéine Tau (Li *et al.*, 2003). La phosphorylation de la protéine Tau, associée à une forme chronique de la neuroinflammation, contribue à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. L'IL-1β participe également au recrutement des LT dans le cerveau, impliqués dans la démyélination des neurones durant la sclérose en plaque, ou la mort des neurones dopaminergiques durant la maladie de Parkinson (McFarland & Martin, 2007; Ferrari *et al.*, 2006).

En conclusion, l'IL-1β est une molécule dont les effets peuvent être à la fois bénéfiques ou délétères pour le fonctionnement du cerveau et la plasticité neuronale. Ces effets dépendent en grande partie : de la concentration de la cytokine, mais aussi de la durée de la présence de la cytokine dans le cerveau qui est influencée par la force du stimulus inducteur (Figure 34). Les niveaux de concentrations permettent d'activer des voies de signalisation différentes, impliquant des conséquences plutôt favorables à la plasticité neuronale à faibles doses et plutôt néfastes à fortes concentrations. Les traitements existants contre la neuroinflammation ciblent l'activation de la signalisation IL-1β ou des NMDAR, ce qui permet de contrebalancer les systèmes et d'améliorer les conséquences neurologiques de la neuroinflammation à court terme (Olivares *et al.*, 2013; Bettiol *et al.*, 2019).

De nombreux mécanismes ont été étudiés pour comprendre comment les effets de cette cytokine varient en fonction des conditions. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'impact de la neuroinflammation chronique sur l'épigénétique neuronale, qui joue un rôle majeur et durable dans la plasticité neuronale et le fonctionnement du cerveau. En effet, une présence en continue de l'IL-1β pourrait déclencher des perturbations de l'épigénétique neuronale, desquelles découleraient les troubles observés durant la neuroinflammation chronique.

3.2.3. Cytokines pro-inflammatoires et épigénétique neuronale

Des modifications épigénétiques ont été identifiées suite à des traumatismes et permettent de déclencher la neuroinflammation (Penas & Navarro, 2018). Mais à l'inverse, les conséquences de la neuroinflammation sur l'épigénétique neuronale sont très peu étudiées. Toutefois, il a été montré que le TNFα peut induire l'hyperacétylation d'histones H4 au niveau du promoteur d'un gène codant pour une sous-unité d'un canal sodium voltage dépendant : Nav1.6, dans les neurones (Ding *et al.*, 2019). D'autre part, des données récentes suggèrent un rôle de la cytokine LIF (*leukemia inhibitory factor*), une cytokine de la classe des IL-6, dans l'induction de la prolifération et de la différenciation des oligodendrocytes. Les mécanismes sous-jacents feraient intervenir la déacétylation d'histones (Roe, 2017). Enfin, l'IL-6 bloquerait la neurogenèse de cellules souches neuronales, en induisant la méthylation de l'ADN au niveau du gène *NeuroD1*, important pour leur différenciation neurogénique. Le blocage de la voie de l'IL-6, impliquée dans cette perturbation, permettrait à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, de récupérer ses capacités de mémoire hippocampo-dépendante (Kong *et al.*, 2019).

Ainsi, l'étude de l'impact de la neuroinflammation et plus particulièrement de cytokines pro-inflammatoires sur l'épigénétique neuronale est un sujet émergent. D'autant plus qu'aucune étude ne s'est encore intéressée à l'impact de la présence chronique d'une cytokine pro-inflammatoire sur l'épigénétique neuronale. Ce type d'étude permettrait d'identifier de nouveaux mécanismes, communs à plusieurs maladies neurologiques, qui expliqueraient que les troubles observés dans ces maladies soient durables. Aussi, l'étude de ces mécanismes est d'autant plus pertinente que le rôle de l'épigénétique dans la réponse adaptative des neurones à leur environnement est importante.

Mon projet de thèse s'est donc concentré sur l'étude de l'impact d'un traitement chronique par l'IL-1β sur un nouveau mécanisme épigénétique crucial dans la plasticité neuronale : les cassures doubles-brin de l'ADN.

Objectifs de la thèse

Les objectifs de mon travail de thèse ont consisté à évaluer les mécanismes qui sous-tendent les dysfonctionnements neuronaux rencontrés au cours d'une infection virale persistante ou de l'inflammation chronique. Du fait de l'importance de l'équilibre entre CDB et réparation de l'ADN dans les neurones sur la physiologie neuronale et le comportement, nous avons fait l'hypothèse que les CDB neuronales seraient le point de convergence mécanistique de ces deux conditions pathologiques.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au rôle direct de l'infection neuronale par le BoDV, un virus qui persiste à vie dans les neurones en y assemblant des usines de réplication qui sont en étroite interaction avec la chromatine. Nous avons alors fait l'hypothèse que cette association à la chromatine pourrait perturber les niveaux de CDB. Cette perturbation pourrait ensuite avoir un impact sur la physiologie neuronale, mais également sur la réplication du virus. Afin de tester notre hypothèse, nous avons utilisé des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat afin d'évaluer l'impact de l'infection sur les niveaux de CBD, les déterminants viraux responsables, ainsi que les conséquences éventuelles sur la réplication virale et le fonctionnement neuronal. Plus concrètement nous avons évalué :

- Les effets de l'infection par le BoDV sur les niveaux de CDB neuronales, en quantifiant des marqueurs de CDB par des approches de *Western blot* semi-quantitatif et d'imagerie cellulaire. Les mêmes approches ont été effectuées après transduction avec des vecteurs lentiviraux exprimant de manière isolée diverses protéines du BoDV ;
- Les éventuelles relations topologiques entre CDB et complexes de réplication viraux, en utilisant des approches de microscopie confocale à super résolution ;
- Les liens entre CDB et réplication virale, en manipulant pharmacologiquement le taux de CDB dans les cultures neuronales ;
- Et enfin, l'impact de ces processus sur l'activité neuronale et la réponse à la stimulation, en utilisant un système d'enregistrement de l'activité neuronale constitué d'un réseau de nano-électrodes.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons cherché à évaluer l'impact de médiateurs neuroinflammatoires sur l'équilibre des CDB. La neuroinflammation contribue en effet à la physiopathologie de nombreuses infections, dont celle par le BoDV, mais elle est également impliquée dans de nombreuses maladies neurologiques. Il s'agit néanmoins d'un processus complexe, faisant intervenir de nombreux acteurs cellulaires et médiateurs solubles. Dans cette partie du travail, nous avons choisi de nous concentrer sur les effets liés à diverses cytokines proinflammatoires sur l'équilibre des CDB neuronales. Dans cet axe de recherche, nous avons alors cherché à :

- Identifier quelles cytokines proinflammatoires pourraient conduire à une modification des niveaux de CDB sur des cultures neuronales ;
- Caractériser les effets de l'exposition chronique à une des cytokines ainsi identifiées, sur les capacités mnésiques et le niveau d'anxiété chez la souris, en réalisant des infusions chroniques à l'aide de mini-pompes osmotiques, suivies de l'application d'une batterie de tests comportementaux.
- Établir les liens mécanistiques possibles entre la signalisation médiée par les cytokines, CDB neuronales et troubles du comportement observés, en utilisant des modèles transgéniques originaux encore non publiés, de délétion conditionnelle et inductible de nos gènes d'intérêts (récepteurs aux cytokines ou molécules impliquées dans la réponse aux CDB) spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe. Ces approches comportementales *in vivo* chez la souris nous ont conduit à la mise en place d'un espace dédié dans notre zootechnie et à la définition de protocoles standardisés pour les analyses comportementales.

Résultats

I. ROLES ET PERTURBATIONS DES CASSURES DOUBLE-BRIN DANS L'ADN DE NEURONES INFECTES PAR LE BODV

Dans cette première partie de mon projet, nous avons étudié l'impact d'une infection par le BoDV, un virus persistant, sur les CDB neuronales. Ce virus se réplique dans le noyau des neurones et ses usines de réplication sont en étroite interaction avec la chromatine. Nous nous sommes posés la question du rôle potentiel des CDB dans la physiopathologie de l'infection par le BoDV.

D'abord, nous avons pu mettre en évidence dans un modèle de culture primaire de neurones que l'infection par le BoDV conduit à une augmentation des niveaux de CDB dans l'ADN des neurones infectés. Le résultat obtenu est d'autant plus surprenant que l'infection par le BoDV ne conduit pas à la production de médiateurs inflammatoires et ne conduit pas à la mort des neurones infectés. Nous avons ensuite déterminé quels déterminants viraux étaient impliqués dans l'augmentation des niveaux de cassures. Par expression isolée de plusieurs protéines virales, nous avons identifié la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P comme étant à l'origine de ces modifications.

Les protéines N et P sont les constituants majeurs du vSPOT, l'usine de réplication virale, qui est en étroite relation avec la chromatine (Hirai *et al.*, 2016; Matsumoto *et al.*, 2012). Nous nous sommes donc demandés, s'il existait une relation topologique entre les vSPOT et les CDB. Grâce à une approche par imagerie à haute résolution, nous avons montré que les CDB étaient colocalisées avec un vSPOT dans plus de 60% des cas d'un neurone infecté ayant une cassure. L'induction de CDB en utilisant un agent pharmacologique permet d'augmenter le nombre de vSPOT par cellule infectée mais renforce également la proportion d'évènements de colocalisation d'une CDB avec un vSPOT. De plus, nous avons montré que l'augmentation des CDB permettait d'augmenter la réplication du BoDV. Ces expériences suggèrent fortement que les CDB pourraient servir de plateforme pour le recrutement de vSPOT favorisant ainsi la réplication du virus.

En conditions physiologiques, ces cassures sont induites par la stimulation neuronale. Dans des neurones infectés par le BoDV, nous ne retrouvons pas l'augmentation de cassures suite à une stimulation suggérant que ces neurones ne répondaient plus à la stimulation. Les CDB induites par la stimulation impliquent l'activation des NMDAR à la membrane des neurones. C'est pourquoi, nous avons commencé par quantifier l'expression de ces récepteurs à la surface des neurones en conditions d'infection. Le BoDV induit une diminution de l'expression des récepteurs au NMDAR à la surface des neurones. Cette diminution de récepteurs à la surface suite à l'infection permet donc de limiter la génération de CDB induites à la stimulation. Ces résultats suggèrent que le BoDV serait capable de contrôler sa propre réplication en inhibant les processus qui favorisent sa réplication, à savoir ici, les CDB.

Ces résultats nous ont aussi mené à explorer l'activité spontanée des neurones infectés. En effet, si les neurones infectés présentent moins de NMDAR à leur surface, alors leur activité devrait être diminuée. Une collaboration de notre équipe avec une autre équipe toulousaine a permis de développer un dispositif qui permet d'enregistrer l'activité des neurones à l'échelle du neurone unique et de façon non invasive. Avec ce dispositif nous avons pu montrer qu'à l'échelle de la cellule unique, les neurones infectés ont une activité spontanée diminuée.

Ainsi, cette première partie de mon projet a permis de mettre en évidence le premier exemple d'un virus à ARN persistant dans les neurones capables de moduler à son compte les CDB neuronales, sans mort neuronale associée. Les vSPOT peuvent colocaliser avec les CDB et l'induction de ces dernières apparaissent être un processus suffisant pour induire la réplication du BoDV. Aussi, le virus modulerait sa propre réplication en inhibant les mécanismes lui permettant de se répliquer, à savoir les CDB induites par la stimulation. Ces perturbations seraient alors une des causes conduisant à une diminution de l'activité spontanée des neurones et *in fine* aux troubles neurologiques observées dans la maladie de Borna. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication actuellement en révision au journal *iScience* (*Cell Press*) et dont le manuscrit intégré en suivant présente les résultats.

Borna disease virus uses neuronal DNA double-strand breaks as docking platforms to ensure viral replication and impairs neuronal activity

Marty FH[1], Bettamin L[1, 2], Thouard A[1], Bourgade K[1], Allart S[1], Larrieu G[2], Malnou CE[1], Gonzalez-Dunia D[1] and Suberbielle E[1].*

[1]Infinity, Université Toulouse, CNRS, Inserm, UPS, Toulouse, France; [2]LAAS-CNRS, Toulouse, France.

*Correspondence and requests for materials should be addressed to E.S. (elsa.suberbielle@inserm.fr)

SUMMARY

Borna disease viruses (BoDV) have recently emerged as zoonotic neurotropic pathogens. These persistent RNA viruses assemble nuclear replication centers (vSPOT) in close interaction with the host chromatin. However, the topology of this interaction, and its consequences on neuronal function remain unexplored. In neurons, DNA double-strand breaks (DSB) have been identified as novel epigenetic mechanisms regulating neurotransmission and cognition. Activity-dependent DSB contribute critically to neuronal plasticity processes, which could be impaired upon infection. Here, we showed that BoDV-1 infection or singled-out expression of Nucleoprotein and Phosphoprotein increased DSB levels in neurons. Interestingly, inducing DSB promoted recruitment anew of vSPOT colocalized with DSB and increased viral RNA replication. BoDV-1 persistence decreased neuronal activity and response to stimulation by dampening the surface expression of glutamate receptors. Taken together, our results propose an original mechanistic crosstalk between persistence of an RNA virus and neuronal function, through the control of DSB levels in infected neurons.

KEYWORDS

Borna disease virus, neurons, DNA double-strand breaks, activity, replication, NMDAR, neuronal function, RNA virus, persistence

INTRODUCTION

The impact of central nervous system (CNS) infections on neuronal physiology represents a fascinating example of host/pathogen interactions (Lathe and St Clair, 2020). In the case of viruses persisting in post-mitotic neurons, neuronal dysfunction upon infection may result from interference with specific cellular pathways. Noteworthy, long lasting changes in neuronal function caused by neurotropic viruses may result from epigenetic changes triggered in the host cells, even without any associated overt neuronal loss, for which the underlying mechanisms remain largely unknown (Galvan et al., 2015; Tsai and Cullen, 2020). This is indeed particularly relevant when considering that epigenetic marks play a fundamental role in neuronal adaptive responses and cognitive functions (Akbarian et al., 2013; Day and Sweatt, 2011). Among these epigenetic processes, DNA double strand breaks (DSB) are increasingly recognized as major regulators of neuronal function.

Until recently, DSB were only considered as being deleterious to genome stability and to result in the activation of apoptotic signaling cascades. However, DSB can also occur during physiological conditions, such as meiosis and ontogeny of T and B cells (Alt et al., 2013; Baudat et al., 2013; Bednarski and Sleckman, 2019). Concerning the CNS, notably post-mitotic mature neurons, increasing evidence points to DSB as major regulators of gene expression, by recruiting epigenetic modifiers and by altering the structure of gene promoters. As a matter of fact, the role of neuronal DSB in carving the epigenetic landscape involved in cognition is an emerging area of research. Interestingly, DSB not only accumulate in the brain of mouse models of Alzheimer's disease (Suberbielle et al., 2015), but they also occur physiologically in healthy post-mitotic mature neurons upon activation by various sensory or cognitive challenges (Suberbielle et al., 2013). Rapidly and efficiently resolved by the DNA repair machinery, these physiological DSB are not deleterious for neurons and may even contribute to the chromatin remodeling mechanisms that are required for memory acquisition (Madabhushi et al., 2015).

Several viruses can efficiently target factors involved in the production by endonucleases, the detection, or the repair of DSB (Hu et al., 2019; Luftig, 2014; Weitzman and Fradet-Turcotte, 2018). However, only a few studies have focused on the impact of RNA viruses on DSB (Chen et al., 2019; Hammack et al., 2019; Hristova et al., 2020; Ledur et al., 2020; Ryan et al., 2016). For *Retroviridae* and *Orthomyxoviridae*, controlling DSB levels is critical to timely delay the induction of apoptosis (Hristova et al., 2020; Khanna et al., 2010; Koyama et al., 2013; Li et al., 2015; Piekna-Przybylska et al., 2017). Moreover, the role of DSB

in the course of these infections has only been studied using mitotic cells. In sharp contrast, studying the responses to DSB in post-mitotic neurons may reveal impaired pathways upon infection, which are key regulators of neuronal function, are not associated to overt neuronal loss, but still induce severe consequences on brain function.

Borna disease virus-1 (BoDV-1), is an ideal model system for this type on investigations. This single-stranded negative persistent RNA virus displays high neurotropism. BoDV-1 can infect a wide range of vertebrate species and recent evidence reports the association of BoDV-1 with fatal encephalitis in humans (Finck et al., 2020; Niller et al., 2020; Schlottau et al., 2018). In animal models, BoDV-1 causes behavioral impairment in infected hosts in absence of overt neuronal loss. Strikingly, it has been shown that BoDV-1 persistence in cell lines results from the interaction of viral ribonucleoparticles (RNP) with the chromatin (Hirai et al., 2016; Matsumoto et al., 2012). Moreover, both BoDV-1 infection and the viral phosphoprotein P have been found to contribute to the deleterious impact of this virus on neuronal function (Betourne et al., 2018; Volmer et al., 2006), notably through epigenetic modifications of neuronal chromatin (Bonnaud et al., 2015; Suberbielle et al., 2008). However, the fundamental questions of if and how BoDV-1 may hijack the DNA DSB response in postmitotic neurons have never been addressed.

In this study, we sought to decipher the interplay between BoDV-1 infection of primary cultures of rat neurons and DSB, and its consequences on viral replication and neuronal function. We found that two viral proteins that are part of the RNP are sufficient to elevate DSB levels in neurons and that viral factories benefit from DSB to increase replication. Infected neurons showed impaired electric activity and response to stimulation. Our work provides new clues to understand the unique challenges that a neurotropic RNA virus faces for its persistence in postmitotic cells and the intricate relationships between neuronal stimulation and RNA virus replication.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Animal handling and care for the preparation of primary neuronal cultures from rat embryos were performed in accordance with European Union Council Directive 86/609/EEC, and experiments were performed following the French national chart for ethics of animal experiments (articles R 214-87 to -90 of the “Code rural”). Our protocol received approval from

the local committee on the ethics of animal experiments (permit number PI-U1043-DD-10). Pregnant rats were deeply anesthetized with CO_2 before euthanasia to minimize suffering.

Virus stocks production

Cell-released virus stocks were prepared using Vero cells persistently infected by wild-type BoDV-1 (Giessen strain He/80) and as previously described (Schmid et al., 2010). Confluent flasks of cells were shocked by a hypertonic solution containing 20 mM Hepes buffer, 250 mM $MgCl_2$ and 1 % fetal bovine serum (FBS, Sigma). Culture supernatants were then clarified with two centrifugations at 2000 g and finally filtered at 0.45 µm. Supernatants were ultracentrifuged on a 20 % sucrose gradient in PBS at 100,000 g at 4 °C. Virus-containing pellets were resuspended in Neurobasal medium and, after brief sonication to facilitate particles solubilization, aliquoted and stored at -80 °C.

Primary cultures of neurons, virus infection and transduction by lentiviral vectors

Primary hippocampal neurons were prepared from Sprague-Dawley rat embryos at gestational day E16 to E18 by a papain dissociation method as described previously (Chevalier et al., 2011). Briefly, hippocampi from the embryo's brain were dissected out and dissociated by papain (Worthington) digestion and mechanic homogenization. Papain digestion was stopped with a solution containing bovine serum albumin (BSA, Euromedex), a protease inhibitor (Trypsin inhibitor from chicken egg, Merck) and DNAse (Roche). Cell homogenates were resuspended in neuronal medium and purified by centrifugation on 4 % BSA in neuronal medium to eliminate glial cells. Neurons were plated on poly-ornithine- (Sigma) and laminin- (Thermoscientific) coated dishes. They were cultivated at a density of $0.5x10^6$ neurons per well in 12-well plates to prepare protein/RNA extracts, or at a density of $1.3x10^5$ neurons per well in 24-well plates containing coverslips for immunofluorescence staining. Neurons were maintained in Neurobasal medium supplemented with 2 % B-27 supplement, 1.2 % GlutaMAX and 120 U : 120 µg/mL of Penicillin : Streptomycin (Life Technologies). Neurons were infected with BoDV-1 (He/80 Giessen strain) at DIV1, DIV7 or DIV9 (according to the experiments) using a Multiplicity Of Infection (MOI) of 0.03. Neurons were transduced by lentiviral vectors at DIV7 at a MOI of 3 for high-density cultures or 0.5 for low-density cultures. Neurons were maintained in culture 2 weeks before analyses, or as specified in each experiment.

Production and purification of lentiviral vectors

HEK293T cells (ATCC CRL-3216) were co-transfected with three plasmids: pMD2.G plasmid encoding the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein (VSV-G, Addgene plasmid 12259, donated by D. Trono), psPAX2 packaging plasmid (Addgene plasmid 12260, donated by D. Trono) and one of the following plasmids coding a BoDV-1 protein or GFP: pTRIP-N, p-TRIP-P, pTRIP-X or pTRIP-GFP (Bonnaud et al., 2015; Ferre et al., 2016) ; using transfection reagent (Genejuice, Millipore). 24 h later, medium was replaced by OptiMEM (Life technologies) medium containing 100 U: 100 μg/mL of Penicillin: Streptomycin. After 24 h and 48 h, supernatants containing lentiviral vectors were harvested, clarified by centrifugation at 2,000 g and then filtered at 0.45 μm. Supernatants were ultracentrifuged on a 20 % sucrose cushion in PBS at 100,000 g at 4 °C. Lentiviral vectors pellets were resuspended in HBSS buffer, aliquoted and stored at -80 °C.

Supernatants swapping

Two weeks post-infection, supernatants were collected from each well for a given condition, pooled, filtered on a 0.22 μm filter (ClearLine). 1 mL of the filtered supernatant from mock-infected cultures was added onto non-infected cultures, and 1mL of filtered supernatant from infected cultures was added onto non-infected and infected cultures. After 5 hours of incubation, proteins were extracted for Western blot analysis.

Western blot analysis

After rinsing cells with 1X phosphate buffer saline (PBS) at room temperature, neurons were lysed on ice using ice-cold RIPA buffer containing Tris-HCl pH 7.5 (50 mM), NaCl (150 mM), NP40 (1%), Sodium deoxycholate (12 mM) and SDS (0.1 %); completed by Complete mini protease inhibitor (Roche) and cocktails 2 and 3 of phosphatase inhibitors (Sigma) and then sonicated. The lysates were centrifugated at 4 °C to eliminate debris and the supernatants were stored at -20 °C. Proteins extracts were loaded on 4-15 % Bis-Tris gels (BioRad), separated by SDS-PAGE and then transferred onto 0.22 μm nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (Li-COR) or 5 % (wt/vol) non-fat dry milk in TBS and incubated with primary antibodies for 3 h at room temperature, or overnight at 4°C, using the following antibodies: mouse anti-γH2A.X monoclonal, dilution 1/1,000 (ThermoFisher, MA1-2022), mouse anti-β-Actin monoclonal, dilution 1/50,000 (Sigma, A5441), mouse anti-α-Tubulin monoclonal, dilution 1/10,000 (Sigma, T6199), rabbit anti-GFP

polyclonal, dilution 1/2,000 (ThermoFisher, A-11122), rabbit anti-N polyclonal antibody, dilution 1/50,000 (homemade), rabbit anti-P polyclonal antibody, dilution 1/50,000 (homemade), rabbit anti-X polyclonal antibody, dilution 1/10,000 (gift by K. Tomonaga and M. Schwemmle) in Odyssey blocking buffer or TBS containing 0.1 % (vol/vol) Tween-20 (TBS-T) and 5 % non-fat milk. Membranes were incubated with corresponding secondary antibodies coupled with infrared fluorescent dye (CF680 and CF770, Biotium) 1/10,000 diluted in Odyssey blocking buffer or in TBS-T with 5 % non-fat milk TBS. Western blot signals were analyzed using an Odyssey Li-COR infrared imaging system coupled with Image studio software (Li-COR).

Indirect immunofluorescence analyses

Neurons on coverslips were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) solution in PBS during 15 min at room temperature, rinsed twice with Tris-Buffered Saline (TBS) and permeabilized with TBS-0.05 % Triton X100 during 5 min. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) was performed according to the directions of the manufacturer of the kit (Thermofisher). After washings with TBS, coverslips were incubated in blocking solution (5 % Normal Goat Serum (NGS) in 0.05 % TBS-Tween20) 1 h at room temperature or overnight at 4°C and then incubated with primary antibodies 3 h at room temperature or overnight at 4°C. Antibodies used were as follows: mouse anti-GFP monoclonal, dilution 1/500 (Millipore, MAB3580), mouse anti-N polyclonal antibody, dilution 1/2,000 (gift from C. Herden), mouse anti-N monoclonal antibody (Bo18), dilution 1/100 (generously provided by Christiane Herden), mouse anti-P polyclonal antibody, dilution 1/500 (homemade), mouse anti-X polyclonal antibody, dilution 1/500 (gift by K. Tomonaga and M. Schwemmle), rabbit anti-N polyclonal antibody, dilution 1/1,5000 (homemade), rabbit anti-53BP1 polyclonal, dilution 1/1,000 (Novus, NB100-304), chicken anti-MAP2 polyclonal, dilution 1/2,000 (Abcam, ab5392), in 0.05 % TBS-Tween20 containing 3 % NGS. Cells were washed 3 times with 0.05 % TBS–Tween20 and incubated with corresponding dye-conjugated secondary antibodies diluted in 0.05% TBS-Tween20 containing 3 % NGS for 1h at room temperature or overnight at 4°C. Secondary antibodies were conjugated to Alexa- (Alexa Fluor 488, 555, 594, 633, Life technologies) or dye StarRed- (750, Abberior) dyes. Finally, nuclei were stained using DAPI during 10 min at room temperature and coverslips were mounted on a slide with ProLong Gold Antifade mounting medium (Life Technologies) or homemade MOWIOL for STED analysis.

Neurons with 53BP1-positive foci were counted using the 40X objective of an Olympus BX41 fluorescence microscope equipped with an X-Cite UV light source, as follows: 2 to 4 fields were counted per coverslip ; 2 to 3 coverslips were considered per condition and per experiment. Between 500 to 1,000 neurons were analyzed per condition and per experiment. For each field, the total number of neurons and the number of neurons presenting at least one focus were counted. For the experiments after etoposide treatment, neurons presenting at least one focus of 53BP1 and at least one vSPOT were randomly counted, analyzing z-stacks acquisitions taken by confocal microscopy on Leica SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) processed on FIJI software. In total, around 200 neurons were counted per condition. The illustrations of immunofluorescence figures (excepting STED experiment) are issued from z acquisitions performed on Leica SP8 confocal microscope followed by standard deviation projection using FIJI software.

Super-resolution analysis

Super-resolution stimulated emission depletion (SR-STED) microscopy images were acquired using a Leica SP8 STED 3× microscope (Leica Microsystems, Germany) and a 100× NA: 1.4 oil immersion objective, as previously used in (Mansuy et al., 2016). To optimize the resolution without bleaching in 3D, the 775 nm STED laser line was applied at the lowest power that could provide sufficient improvement in resolution compared with confocal. z-stack series were acquired sequentially with the pulsed 532 nm laser line and the pulsed 635 nm laser line. With such settings, lateral and axial resolutions of 130 nm could be reached for both acquisition channels. For image acquisition, we used the following parameters: 43 nm pixel size, two-time average par line, 400 Hz scan speed. The z-stacks of 25 neuronal nuclei presenting DSB were randomly acquired per experiment and 3 independent experiments were run (z-step: 40nm). The z-stacks were screened with the merged z-stack display on the Leica SP8 LSM software to count the number of DSB per nucleus, vSPOT per nucleus and the number of colocalization events. STED images were subsequently deconvolved with Huygens Professional (SVI, USA) using the CMLE algorithm, with a signal-to-noise ratio (SNR) of 7. Three-dimensional visualization and reconstruction using Imaris software (Bitplane AG, Switzerland) were used to measure the distance between 53BP1 positive foci of DSB and vSPOT in the nuclei of neurons. Imaris software was used to automatically identify vSPOT and 53BP1 foci and calculate the shorter distances between them, after thresholding and 3D reconstruction. After this reconstruction, a movie was also generated from an example of colocalization. Illustrations

were obtained by maximal projection of 3D confocal STED z-stacks images after deconvolution.

Neuronal treatments

All stimulations were done at DIV14, after pre-treating neurons with 20 μM NBQX (Tocris) during 30 min., to inhibit non-NMDA-type glutamate receptors. To achieve global activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), after washing cells with 1X PBS at 37°C, neurons were stimulated with 15 μM NMDA (Sigma) in prewarmed conditioned media during 30 min. To study the link between DSB and viral replication, infected neurons were treated with various concentration of etoposide (ETP; Sigma) in DMSO, 2 days post-infection (dpi) during 5 days (vSPOT and DSB analysis), or treated 5 dpi during 24, 48, 72 hours (viral RNA (vRNA) analysis). The same final concentration of DMSO treatment was used as negative control. All drugs were applied directly to the medium, and the neurons were maintained at 37°C with 5% CO_2 during all treatments.

RT and qPCR for measurement of viral RNA

At DIV9, neurons were infected by BoDV-1 at MOI = 0.03. 5 days post-infection, neurons were treated with ETP at 0.5 μM or with DMSO alone. 24, 48 or 72 hours after treatment, total RNA was extracted. Total RNA was prepared from cells using a Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed using LunaScript™ RT SuperMix Kit (New England BioLabs). Quantitative PCR was performed on cDNAs using sets of primers specific for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for normalization (forward primer, 5' TGCTGGTGCTGAGTATGTCG 3'; reverse primer, 5' GGCGGAGATGATGACCCTTT 3') or with primers specific for viral cDNA (forward primer, 5' CCTTCTAACAAAATGAATACACGC 3'; reverse primer, 5' CTGATATCCTTCTCATGCCC 3'). qPCRs mix were made using Light-Cycler 480 DNA SYBR green I Master reaction mix (Roche Diagnostics) and run in duplicates using a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics). PCR cycles were as follows: after an initial incubation at 95 °C for 5 min, 40 amplification cycles were run (at 95 °C for 10 s, 60 °C for 15 s, then 72 °C for 15 s) followed by melting curve analysis. Viral genome quantification was expressed in arbitrary units according to the following threshold cycle (C_T) formula: amount of viral RNA = $2^{-(Ct\,\mathrm{BoDV} - Ct\,\mathrm{GAPDH})}$.

NMDAR immunostaining and quantification

To stain for surface NMDAR only, neurons on coverslips were incubated with rabbit anti-GluN2A polyclonal antibody, at a dilution of 1/100 (Invitrogen, #480031) in cold Tyrode medium: NaCl (119 mM), KCl (5 mM), $CaCl_2$ (2 mM), $MgCl_2$ (2 mM), Hepes (25 mM), glucose (30 mM) on ice during 45 min. Then, the coverslips were washed three times in cold 1X PBS and incubated for 15 min on ice, in a solution of 4 % PFA in PBS. Following a step of permeabilization and blocking, immunofluorescence stainings were performed as previously described. Coverslips were stained with anti-MAP2 antibody and, to detect total GluN2A signals, part of them was stained with anti-GluN2A antibody, overnight at 4 °C. High-resolution z-stacks of images were generously acquired by Zeiss France representative in airyscan mode using a Zeiss LSM 980 with Airyscan 2, using all identical parameters between samples. Images represents the maximal projection of 4 confocal planes (step: 0.169 μm). Quantification of GluN2A expression was performed from z-stacks acquisitions, at the 63x objective with a zoom factor of 3, taken by confocal microscopy on Leica SP8 confocal microscope. Identical settings for laser power, photomultiplier gain and offset were used for all experiments. Neurons were randomly selected, but those grouped in clusters and without detectable distinct neurites were excluded, to avoid bias in measurements of potential overlapping neurites. On the GluN2A channel, images were analyzed on FIJI software: after stack summation, the background was subtracted using the rolling ball and sliding paraboloid tools of the software. Regions Of Interest (ROI) were manually drawn on the projection of MAP2 staining to define neurites regions and measure their area. GluN2A projections were thresholded to include all the GluN2A signals grouped as clusters. Clusters were defined as groups of at least 3 pixels. Particles measuring less than 3 pixels were arbitrarily considered as not representative of a GluN2A cluster and were excluded from the measurements. The ROI were used to measure the thresholded GluN2A signal. The results were finally presented as intensity per μm^2 of neurites. 2 to 7 neurites were analyzed from 3 to 7 neurons over 2 coverslips per condition, in 3 independent experiments, for GluN2A surface and total quantifications. In average, were assessed 74 *vs.* 84 (NI vs. BoDV) dendrites for surface expression of GluN2A and 102 *vs.* 94 (NI *vs.* BoDV) dendrites for total expression of GluN2A.

Spontaneous electric activity recordings using nanoelectrode arrays, recording setup and activity analysis

The nanoelectrode array devices were fabricated in the LAAS-CNRS clean room, using a series of micro-technology processes compatible with a large-scale type of fabrication

(Casanova et al., 2018). Briefly, the device is composed of a cultured chamber (well) containing 60 nano-electrodes composed by 3D nanowires coated with a platinum silicide (PtSi) biocompatible surface. Each electrode is electrically isolated thanks to an oxide layer. The recording setup was also mainly developed at the LAAS. It is composed of an MEA holder (MEA1060-Inv-BC from Multichannel System), a homemade electronic card where the integrated electronics allows to control the system and an acquisition card (USB 6353 from National Instruments). The recording setup is controlled by a homemade software developed on LabVIEW that allows live recordings on multiple channels, saving the data and performing online data treatment such as filtering and averaging. The cell recordings were performed with neurons maintained inside an incubator at 37 °C with controlled humidity and 5 % CO_2. Each electrode was recorded 5 to 6 times during 3 minutes in groups of 15 electrodes, one group after the other in 3 independent experiments (1 well of 60 electrodes per condition). Once the data were acquired, a MATLAB script was used for the offline treatment. A peak detection algorithm was used to evaluate the frequency of activation of each electrode. The threshold for the peak detection was calculated using the standard deviation of the background noise. Electrodes presenting aberrant recordings were excluded. Active electrodes were considered as electrodes where at least one peak was recorded.

SEM imaging

Cells were fixed with 5 % glutaraldehyde in PBS overnight at 4 °C, rinsed 3 times with PBS 1X and dehydrated by graded series of ethanol and dried at room temperature. Images of the cell cultures are done with a Scanning Electron Microscope (Helios 600i).

Blind-coding and statistical analysis

Investigators who obtained data were blinded to infection and treatment of cell cultures. Sample sizes were chosen on the basis of pilot experiments and our experience with similar experiments. Statistical analyses were performed with Prism 8 (GraphPad). Normal distribution of the data was verified with D'Agostino and Pearson's omnibus normality test and Bartlett-test was used to verify equality of variance. Welch's correction was applied when the variances were not equal. Each statistical test is specified in the legend of each figure. Null hypotheses were rejected at the 0.05 level.

RESULTS

BoDV-1 infection increases DSB levels in primary neurons

To determine whether BoDV-1 persistence could impact on physiological DSB levels in neurons, we infected primary cultures of hippocampal rat neurons and measured the levels of specific DSB hallmarks in neurons at 13 days post infection (DPI). As previously documented (Hans et al., 2004), neuronal cultures are 100% infected by BoDV-1 at that time point (Fig.1A and B). To mark DSB, we first assessed expression of 53BP1, which is recruited specifically to DSB sites, where it forms foci (Anderson et al., 2001; Suberbielle et al., 2013). By immunofluorescence microscopy, 53BP1 displays bright focal fluorescence at DSB site and a characteristic staining in neurons that allows to specifically distinguish them from glia (Suberbielle et al., 2013; Torres et al., 2015) (Fig.1B and C). We found that BoDV-1 infection increased by 60 % the number of neurons displaying 53BP1-positive foci, when compared to mock-infected controls (NI) (Fig. 1D). Next, we used western-blot analysis to evaluate phosphorylation levels at serine 139 of Histone 2A variant X (γH2A.X), which is also recruited at DSB sites. Consistent with our analysis of 53BP1, we observed that γH2A.X protein levels were increased in infected neurons compared to mock-infected cultures (Fig. 1E and F). Importantly, we ruled out the hypothesis that the increased DSB levels detected in BoDV-1-infected cultures might result from apoptosis, by performing TUNEL staining analyses which confirmed that BoDV-1 infection did not lead to neuronal apoptosis (Suppl. Fig. 1). Next, to test whether increased DSB levels in BoDV-1-infected cultures could be caused by the release of soluble factors in the culture medium upon infection, we swapped medium between BoDV-1- and Mock-infected cultures (Suppl. Fig. 2). We observed that incubating non-infected neurons for 5 hours with the medium of BoDV-1-infected neurons did not increase γH2A.X levels, whereas at that time, the incubation of neurons with either amyloid-β oligomers or pro-inflammatory cytokines was sufficient to induce DSB (Suberbielle et al., 2013) and data not shown). Hence, the increased DSB levels likely directly result from the presence of BoDV-1 in neurons.

BoDV-1 Nucleoprotein and Phosphoprotein induce DSB in neurons

To assess whether the singled-out expression of any viral protein could similarly increase DSB levels in neurons, we transduced primary neurons with lentiviral vectors (LV) expressing two main components of the BoDV-1 ribonucleoparticle, the Nucleoprotein (N) and

Phosphoprotein (P), as well as the non-structural X protein. We explored DSB levels 7 days post-transduction, at 14 days *in vitro* (DIV), to allow both completion of post-integration DNA repair of the lentiviral vectors (Skalka and Katz, 2005) and good expression of the transgene proteins (Figure 2). After confirming the expected partly nuclear pattern of expression of the green fluorescent protein (GFP), N, P and X in neurons by immunofluorescence confocal microscopy, we could already detect increased levels of 53BP1 foci in neurons transduced with LV-N or LV-P, but not with LV-GFP or LV-X, with a trend to display more than one focus per cell (Fig. 2B-C). Likewise, Western-blot analyses showed that expression of either N or P increased γH2A.X levels in neurons by 50 %, whereas X or GFP did not lead to any change in DSB levels (Fig. 2D-F).

BoDV-1 nuclear viral factories are located in the direct vicinity of neuronal DSB

Having shown that N and P, which are two main components of BoDV-1 viral factories, called vSPOT (for viral SPeckles Of Transcripts) induce DSB in neurons, we decided to explore the spatial relationships between DSB and vSPOT in the nuclei of neurons. To this aim, we analyzed neuronal staining by super-resolution confocal microscopy using STED technique (Figure 3). We found that vSPOT events were colocalized at 63.8 % ± 21.4 SD with a 53BP1-positive focus when both events could be visualized in the same neuron (Fig. 3B-D), and as illustrated in the 3D reconstruction of a nucleus structure and animated view (Fig.3C and video 1). When they were not co-localized, there was no specific pattern in the distance between vSPOT and 53BP1-positive foci (Fig. 3A and D).

Thus, our results indicate that vSPOT preferentially locate at the level of DSB in the chromatin of neurons.

Etoposide-induced DSB activate BoDV-1-replication

The close spatial relationship between vSPOT and DSB foci led us to hypothesize that DSB may be used as hubs for the virus to replicate and may, in turn, modulate viral replication. Therefore, to test if DSB may promote or impede viral replication in the case of a persistent RNA virus, we increased steady-state DSB levels in neurons using etoposide (Figure 4). First, we infected primary cultures of neurons with BoDV-1 at 7 DIV, to allow viral spread in already mature neuronal networks able of spontaneous activity. Neurons were treated with varying concentrations of etoposide 2 days later, to analyze a potential recruitment of BoDV-1 viral factories to newly-induced DSB (Fig.4A). With this experimental set-up, we first evidenced a dose-dependent increase in the number of neurons with 53BP1-positive foci and an increase in

the number of foci per nucleus (Supplementary Figure 3 and Fig.4B, C). Strikingly, this increase in DSB was associated with increased numbers of vSPOT per cell (Fig. 4B). For instance, infected neurons exposed to 0.5μM of etoposide displayed increased numbers of DSB foci (Fig. 4B, C) and of vSPOT (Fig. 4B, D) per cell compared to vehicle-treated controls, together with a 1.8-fold increase in the number of neurons with a vSPOT colocalized with a DSB. vSPOT were mostly co-localized with 53BP1-positive foci and the percentage of colocalization events increased by 66.4 %. Hence, induction of multiple DSB in neurons promotes the assembly of viral factories. Next, to determine whether these increased numbers of vSPOT also resulted in accrued replication of the viral RNA, we performed RT-qPCR. Incubating neurons with 0.5 μM of etoposide starting 5 days post-infection for various periods of time (Fig. 4E) allowed us to determine that increasing the number of DSB and viral factories in neurons accrued the replication of the viral RNA by 33 % most significantly after 72 hours of incubation with etoposide (Fig. 4F). Together, these results show that increasing DSB in neurons by etoposide treatment promotes assembly of viral factories in contact to these newly-formed DSB and stimulates viral replication.

BoDV-1-infected neurons do not respond to NMDA-stimulation of activity

It has been shown that stimulation of glutamatergic N-methyl D Aspartate Receptors (NMDARs) at the surface of neurons with their agonist (NMDA) cause transient increases in DSB levels in neurons (Crowe et al., 2006; Madabhushi et al., 2015; Suberbielle et al., 2013). This led us to explore the impact of BoDV-1 neuronal infection on the DSB response after mild stimulation with NMDA. Consistent with previous reports (Crowe et al., 2006; Madabhushi et al., 2015; Suberbielle et al., 2013), exposure of uninfected neurons to NMDA caused a 75 % increase in DSB levels 30 minutes post-treatment (Fig. 5A, B). In contrast, NMDA treatment of BoDV-1-infected neurons failed to further increase DSB levels, which remained in the 30 % range of increase found in non-treated infected cultures (cf Figure 1). This result suggests that BoDV-1 infection may interfere with signaling pathways that convey the signal of glutamatergic stimulation from the neuronal cell surface to the nucleus.

To explore the underlying mechanisms of this interference, we first asked whether BoDV-1 infection of neurons may alter the cell surface distribution of NMDAR. We performed immunocytochemistry staining followed by confocal analyses of the surface expression of GluN2A, the most commonly expressed NMDAR subunit in mature excitatory neurons (Wyllie et al., 2013)(Supplementary Figure 4 and Fig. 5E, F). We detected a 30 % decrease in surface expression of GluN2A on BoDV-1-infected neuronal dendrites compared to non-infected

neurons, whereas total levels of GluN2A were slightly increased by BoDV-1 infection (Fig. 5C, D). Hence, these findings show that once neurons are steadily infected by BoDV-1, surface expression of NMDAR is inhibited, suggesting that the virus may prevent neuronal activity.

BoDV-1-infected neuronal networks display altered spontaneous electric activity

The accumulation of DSB in neurons has been previously shown to cause neuronal dysfunction, notably by interfering with the expression of activity-related genes. Thus, accumulation of DSB due to BoDV-1 infection may durably alter neuronal function and impact on electric activity. To test this hypothesis, we used a novel device, which has been recently implemented in our lab, to measure the spontaneous electric activity of neuronal network at the single neuron level, using nanoelectrode arrays (Fig. 6A and Supplementary Figure 5). Using this setup, we first observed that fully BoDV-1 infected cultures displayed on average a 25 % decrease in the number of active electrodes compared to non-infected controls (Fig. 6A and Table 1). There were no noticeable differences between the two conditions in terms of the morphology of neuronal networks, as observed by scanning electron microscopy (Supplementary Figure 5). Finally, we designed a tool to count the numbers of peaks of voltage potentials above the baseline threshold of each electrode (Fig. 6B). Using this tool, we found that BoDV-1 infection decreased the number of peaks/min by half compared to non-infected cultures (Fig. 6B, C). Thus, BoDV-1 infection of neurons impairs spontaneous electric firing within neuronal networks, which is in line with decreased surface expression of GluN2A.

DISCUSSION

Our study shows that BoDV-1 infection elevates steady-state DSB levels in primary neurons. This is directly due to the presence of the virus in the neurons and could also be reproduced by the singled-out expression of N and P proteins, two main components of the nuclear viral factories. We also demonstrate the close topological association between viral factories attached to the chromatin and DSB, and provide evidence suggesting that BoDV-1 may use DSB as "docking platforms" to facilitate its replication. On the neuronal side, we show that BoDV-1 impairs neuronal firing and decreases surface localization of glutamatergic NMDAR.

Importantly, we only observed a mild increase in DSB markers levels, revealed by a limited number of foci per neuron. Because DNA DSB response triggers apoptosis when the severity of the damage is too important to be repaired, our data are consistent with our TUNEL

assay results, as well as with our previous demonstrations that BoDV-1 is indeed non cytolytic in neurons (Hans et al., 2004).

Our study therefore uncovers the first example of an actively replicating RNA virus able to manipulate the DSB neuronal responses to favor the assembly of viral replication complexes and viral persistence, without causing any overt neuronal death. This is in sharp contrast with the situation observed with *Orthomyxoviridae* – the other family of negative-sense RNA genomes replicating in the nucleus – which induces DNA damage related to cellular death (Khanna et al., 2010; Li et al., 2015). Likewise, dysregulated DNA DSB responses for viruses generally lead to either apoptosis or oncogenesis (Chen et al., 2019; Hristova et al., 2020; Ledur et al., 2020; Luftig, 2014; Patra et al., 2020; Ryan et al., 2016; Weitzman and Fradet-Turcotte, 2018). The only viral example comparable to our findings can be found for the control of latency – *e.g.*, with no viral production – of Herpes simplex viruses, which modulate Topoisomerase 2β activity to maintain latency (Hu et al., 2019).

Additionally, our data reveal a tight relationship between viral replication and DSB production. In particular, the topological relationship between vSPOT and DSB foci is striking: to our knowledge, such a tight contact between host DNA DSB and viral RNA genome has never been described to date. Noteworthy, by STED microscopy, colocalized DSB foci and vSPOT were interwoven. Thus, DSB and associated DSB response molecules may form a docking site for vSPOT. This hypothesis is further supported by our results on etoposide-treated neurons: inducing new DSB rapidly recruits foci-colocalized vSPOT. This raises now the question of how BoDV RNP may bind to DSB sites. In line with our results, direct interactions between BoDV-1 P and N with chromatin-binding proteins had already been identified in replicating cell lines but not in neurons. High-mobility group binding protein 1 (HMGB1), Poly-ADP-ribose polymerase 1 (PARP-1) and core histones H3, H2A and H2B interact with P and N, respectively (Matsumoto et al., 2012). Interestingly, HMGB1, a minor groove binder, and PARP-1, a chromatin-decompaction enzyme, play roles in DNA repair and their levels and activities are altered with age in neurons and inversely correlate with DSB accumulation (Enokido et al., 2008; Mandke and Vasquez, 2019; Mao and Zhang, 2021).

Another interesting finding is that the colocalization between DSB and vSPOT seems to obey to a "all or nothing" rule. Indeed, if most DSB foci co-localize with at least one vSPOT, when no colocalization is evidenced, the distance between the two becomes variable. These observations may result from the kinetics of viral replication, with the colocalization corresponding to recently-formed vSPOT, at a place of a pre-existing break. The apparent

steady replication of BoDV-1 in neurons, with continuous expression of viral proteins, assembly of viral replication complexes, and release of new virions (Cubitt and de la Torre, 1994; Gonzalez-Dunia et al., 1996), may seem contradictory with the non-cytolytic nature of this infection, suggesting unknown mechanisms of control between the host cell and the pathogen. Here, our findings suggest a new mechanism involving a feedback loop between viral replication and excitatory glutamate signaling pathways: the direct trigger of Topoisomerase 2β-dependent DSB, which would increase BoDV-1 replication **(Supplementary Figure 6)**. Indeed, Etoposide does not directly generate DSB. Rather, it prevents their repair through the inhibition of the ligase activity of Topoisomerase 2β (Hu et al., 2019; Madabhushi et al., 2015). On the other hand, at steady state, infected neurons would display lower current frequencies, and be less electrically active. Consistent with this hypothesis, we observed that incubating infected neurons with NMDA to stimulate NMDA receptors — receptors that induce DSB by stimulating Topoisomerase 2β endonuclease activity (Madabhushi et al., 2015) — did not result in further increase in DSB, indicating that BoDV-1 likely uncouples NMDARs from their signaling to the generation of new physiological DSB. At the molecular level, this uncoupling may result from the decreased cell surface expression of NMDAR, as evidenced in our study with their core subunit GluN2A. This finding is in line with our previous description that BoDV-1 P protein inhibits Protein Kinase C (PKC) activity and the subsequent phosphorylation of its target SNAP-25 (Betourne et al., 2018). Indeed, considering that PKC activity and SNAP-25 play critical roles in the maintenance of NMDAR at the neuronal cell surface (Lau et al., 2010; Vieira et al., 2020), our results suggest that BoDV-1 P protein may shut off pathways that cause activity-dependent DSB, while increasing DSB levels in the context of BoDV-1 infection. Thus, the P protein may play a pivotal role not only in the regulation of viral replication, but also of neuronal activity. Therefore, we could envision that neuronal activity and associated DSB may promote docking of vSPOT and favor the early stages of neuronal infection; Next, this would lead to the production of viral factors, including P, which would shut off activation of the neurons, thereby putting a brake on DSB production and limiting overloading the neuron with viral materials which could trigger apoptosis **(Supplementary Figure 6)**.

Finally, even limited numbers of DSB have been shown to critically impact on cell function (Madabhushi et al., 2015; Suberbielle et al., 2013; van den Berg et al., 2018). For instance, activity-induced, Topoisomerase 2β-dependent neuronal DSB are sparse, but they target genomic regions that mainly code for survival signals and activity-related proteins

(Madabhushi et al., 2015). Likewise, only few 53BP1-positive foci are observed in neuronal nuclei of a mouse model of Alzheimer's Disease, yet, they seem sufficient to cause cognitive decline (Suberbielle et al., 2015; Suberbielle et al., 2013). In the recent years, the idea has emerged to consider neuronal DSB as key epigenetic processes regulating gene expression in neurons. In these non-dividing cells that establish lifelong specialized networks, while remaining able of a high degree of adaptability called plasticity, epigenetic mechanisms are critical regulators. As a result, epigenetic processes of the host cell are also often hijacked by persistent viruses (Bonnaud et al., 2016; Lange et al., 2020; Mourão Diego, 2020) and BoDV-1 is no exception: our group and others identified BoDV-1 P-mediated interference with acetylation of Histone H2B, and H3 (Bonnaud et al., 2015; Jie et al., 2018). Because DSB can be induced by both P and N proteins, and that early DSB accumulation in neurons increases Histone H3 lysine 9 dimethylation (Suberbielle et al., 2015), which corresponds to inhibitory signals of gene expression, it is tempting to speculate that DSB and their signaling may play an upstream role in the further deacetylation of histones.

Because increasing evidence has documented human cases of BoDV-1 infection and encephalitis following immunosuppressive treatment, notably in solid-organ transplant recipients (Finck et al., 2020; Korn et al., 2018; Niller et al., 2020; Schlottau et al., 2018), it indicates that BoDV-1 may persist almost silently in the human immunocompetent brain. Thereof, shedding light on neuron-specific pathophysiological mechanisms of BoDV-1 persistence, deciphering the signaling pathways linking DSB and neuronal activity are key to better understand the unique interaction of this RNA virus with its major target cell, the neuron.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank first response Health care workers against COVID-19; Christiane Herden, Keizo Tomonaga and Martin Schwemmle for their generous gifts of mouse anti-BoDV-1 N, and anti-X antibodies, respectively; Zeiss France for his assistance in using the Zeiss LSM 980 with airyscan 2; the US006 CREFRE/ANEXPLO for their assistance in rodent husbandry, members of Team ViNeDys at Infinity for helpful discussions and R. Liblau for his critical reading and insightful comments on our manuscript. This work was supported by grants from Marie Curie RI Europe H2020 to ES, by institutional grants from INSERM, CNRS, University Paul Sabatier, LAAS-CNRS micro and nanotechnologies platform as a member of the Renatech french national network, and a Boehringer-Ingelheim Fonds fellowship to FM. This work is part of FM's Ph.D. thesis projects.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: FM, LB, GL, DGD and ES. Performed the experiments: FM, LB, AT, KB and SA. Analyzed the data: FM, LB, SA, GL, CM, DGD and ES. Wrote the paper: FM and ES with help of coauthors.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: BoDV-1 increases levels of DNA double-strand breaks markers 53BP1 and γH2A.X in primary neurons. A) Schematic representation of the experimental strategy using primary cultures of rat hippocampal neurons and BoDV-1 infection. **B)** Confocal microscopy analysis of 53BP1 staining (red) in Nucleoprotein-(green) and MAP2-positive (blue) neurons from BoDV-1 (BoDV) *vs.* non-infected (NI) cultures. Scale bar: 20 μm. **C)** Insets views are displayed from B) showing 53BP1-positive foci of DSB (arrows) in neurons (MAP2, in blue) from BoDV-1 *vs.* NI cultures. Scale bar: 10 μm. **D)** Numbers of neurons with 53BP1-positive foci were counted and are expressed as average percentages of foci-positive neurons. 2358 NI- and 2697 BoDV-1 infected neurons were observed in n= 2-3 fields on 4-6 coverslips per condition from 3 independent experiments. ***p = 0.001 *vs.* NI by unpaired *t*-test **(E-F)** Levels of the DSB marker γH2A.X were determined by Western blotting. **E)** A representative Western blot. Nucleoprotein (N) and β-actin levels were also detected **F)** Quantitation of Western blot signals. The average γH2A.X to β-actin ratio in non-infected cultures was defined as 1.0. n = 2-6 wells per condition from 7 independent experiments. ****p<0.0001 *vs.* NI by unpaired *t*-test with Welch correction. Bars represent means ± SEM.

Figure 2: BoDV-1 Nucleoprotein N and Phosphoprotein P increase DSB levels in neurons. Primary cultures of rat neurons were transduced 7 days after seeding (DIV) by lentiviral vectors (LV) to express BoDV-1 Nucleoprotein (N), Phosphoprotein (P), X protein (X) or green fluorescent protein (GFP) as a control. Wells that were not transduced are shown as mock. 7 days post-transduction (dpt), expression of these proteins and DSB markers were assessed by confocal microscopy (B, C), and their levels were assessed by Western blot analysis (D-F). **A**) Schematic representation of the experimental strategy **B)** 53BP1 staining (red) in N- *vs.* P- *vs.* X- *vs.* GFP-expressing (green) and MAP2-positive (blue) neurons was visualized by confocal microscopy. Scale bar: 20 μm **C)** Insets views from B) of the triple staining are shown at higher magnification. Arrows indicate DSB foci. Scale bar: 10 μm. **(D-F)** Levels of the DSB marker γH2A.X were determined by Western blotting. (**D-E)** Representative Western blots are shown. **F)** Quantitative analysis of the Western blot signals. The average γH2A.X to β-actin ratio in mock-transduced cultures was defined as 1.0. n = 2 to 4 wells per condition from 5 to 16 independent experiments. ns, non-significant ***p<0.001, **p<0.01 *vs.* mock by Dunnett *post-hoc t*-test with Welch correction. Bars represent means ± SEM.

Figure 3: BoDV-1 vSPOT and DSB are strongly colocalized in infected neuronal nuclei. Super resolution confocal microscopy analysis was performed by STED technology on BoDV-1-infected rat neurons at 13 dpi. **(A-B)** Representative 2D-STED images of 53BP1-positive (in red) DSB foci (plain arrow), and Nucleoprotein-positive (in green) vSPOT (empty arrow) staining and merged images of the same confocal planes. **A)** Representative example of a neuronal nucleus with no colocalization between DSB and vSPOT. **B)** Representative example of a neuronal nucleus with fully colocalized DSB and vSPOT. Scale bar: 5 μm. **C)** Representative 3D-STED 3D reconstruction view of a nucleus (in blue) with colocalized 53BP1-positive DSB foci (in red) with Nucleoprotein-positive vSPOT (in green). The full 3D reconstruction can be observed as a 3D-animation in supplementary video 1. Scale bar: 2 μm. **D**) Quantitative analysis of the distribution of neuronal nuclei with 53BP1-positive foci and their nearest vSPOT in function of the distance between these two events, expressed as the average percentage for each distance interval measured. n = 22-61 nuclei analyzed per experiment from 3 independent experiments. Bars represent means ± SEM.

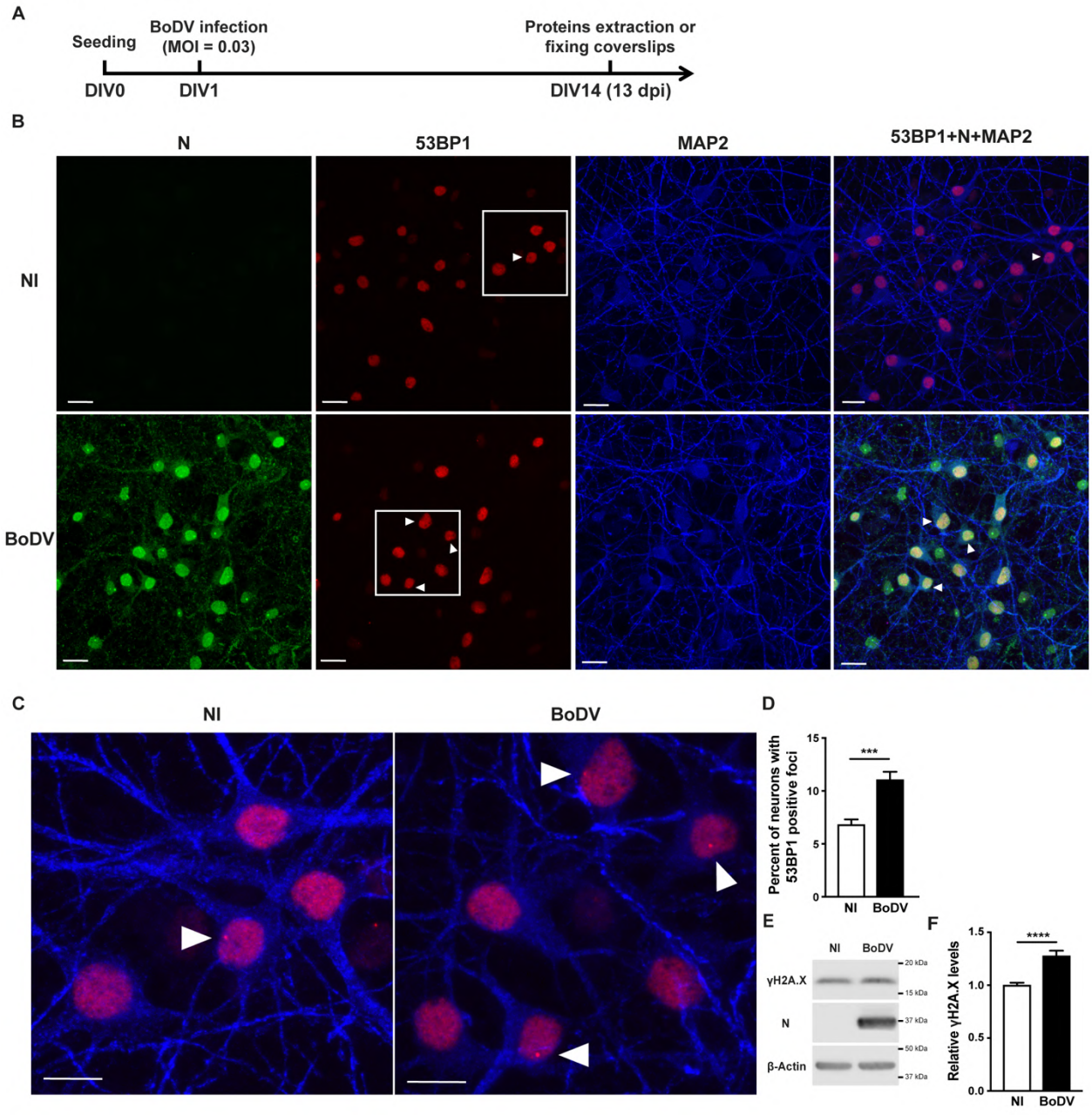
Figure 4: Induction of DSB in neurons by etoposide increases numbers of colocalized DSB/vSPOT per neuron and viral RNA replication. A) Schematic representation of the experimental strategy. Primary cultures of rat hippocampal neurons were infected by BoDV-1 and treated with the DSB-inducing agent etoposide (ETP) or its vehicle DMSO, followed by immunofluorescence analysis. **(B-D)** The numbers of DSB, vSPOT, and the levels of colocalization of these two nuclear events were assessed by manual counting following immunofluorescence staining of 53BP1-positive foci of DSB (in red), and Nucleoprotein-positive (N) vSPOT (in green) analyzed by confocal microscopy. **B)** Representative confocal images of DSB foci, vSPOT and their colocalization (arrow), for experiments using 0.1 or 0.5 μM etoposide, or vehicle-treated (DMSO) cultures. Scale bar: 10 μm. **C)** Distribution as percentage of the counts of infected neurons displaying DSB foci in three categories (1, 2 or ≥3 DSB/cell) depending on the numbers of foci per nucleus observed. **D)** Distribution of the counts of the same neurons displaying vSPOT in three categories (1, 2 or ≥3 vSPOT/cell) depending on the numbers of events per nucleus observed. n = 22 to 44 neurons analyzed from 2 coverslips per condition, from 3 independent experiments. ns, non-significant, ****p<0.0001 by Multiple *t*-test. **(E-F)** Quantitative analysis by RT-qPCR of BoDV-1 viral RNA levels in rat hippocampal rat neurons, after infection by BoDV-1 and at 3 different times post-treatment with etoposide (ETP) or vehicle (DMSO). **E)** Schematic representation of the experimental strategy ; **F)** Changes in RNA levels are expressed as compared to the DMSO condition, for which the average ΔΔCt (normalized on GAPDH) were set to 1. n = 2 wells analyzed each in duplicates, per condition from 4 independent experiments. ns, non-significant, **p<0.01 by Bonferroni *post-hoc t*-test. Bars represent means ± SEM.

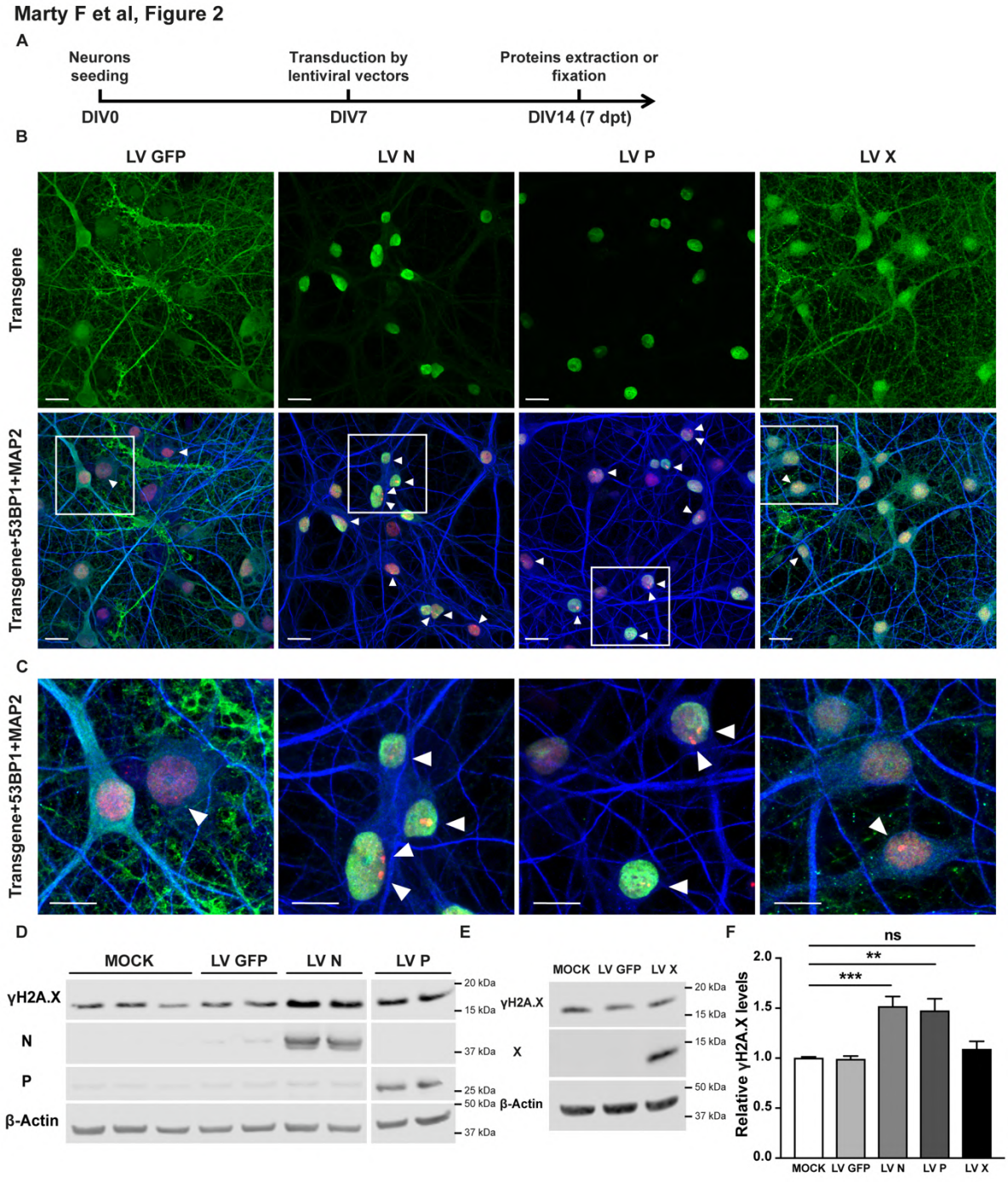
Figure 5: Persistent BoDV-1 infection prevents activity-induced DSB in neurons by decreasing surface expression of NMDA Receptors (NMDARs). (A, B) When primary neuronal cultures were fully and steadily infected (BoDV), neurons were incubated with the NMDARs selective agonist NMDA (+) or vehicle (-) for 30 minutes. DSB levels were assessed by Western blot analysis. **A)** A representative Western blot is shown. **B)** Quantitation of Western blot signals. The average γH2A.X to α-Tubulin ratio in non-infected (NI) cultures was defined as 1.0. n = 2-3 wells per condition from 8 independent experiments. **(C-F**) Total (C-D) and surface (E-F) expression of the GluN2A subunit of NMDARs were quantified by immunofluorescence staining followed by confocal microscopy analysis. **(C, E)** Representative

high-resolution images obtained using airyscan 2 technology are shown of total **(C)** and surface **(E)** GluN2A signals (in green) in dendrites (MAP2, red) from BoDV-1 *vs.* non-infected (NI) neurons at 16DIV. Scale bar: 2 μm **(D, E)** Quantitative analyses of total **(D)** and surface **(F)** GluN2A clusters of signals are shown. The average GluN2A signal measured in each experiment in NI cultures was defined as 1.0. In average, were assessed 74 vs. 84 (NI vs. BoDV) dendrites for surface expression of GluN2A and 102 vs. 94 (NI *vs.* BoDV) dendrites for total expression of GluN2A. n = 3 independent experiments. ns, non-significant, *p<0.05, ****p<0.0001 by Tamhane T2 *post-hoc t*-test with Welch correction (B), or by unpaired *t-test* (F). Bars represent means ± SEM.

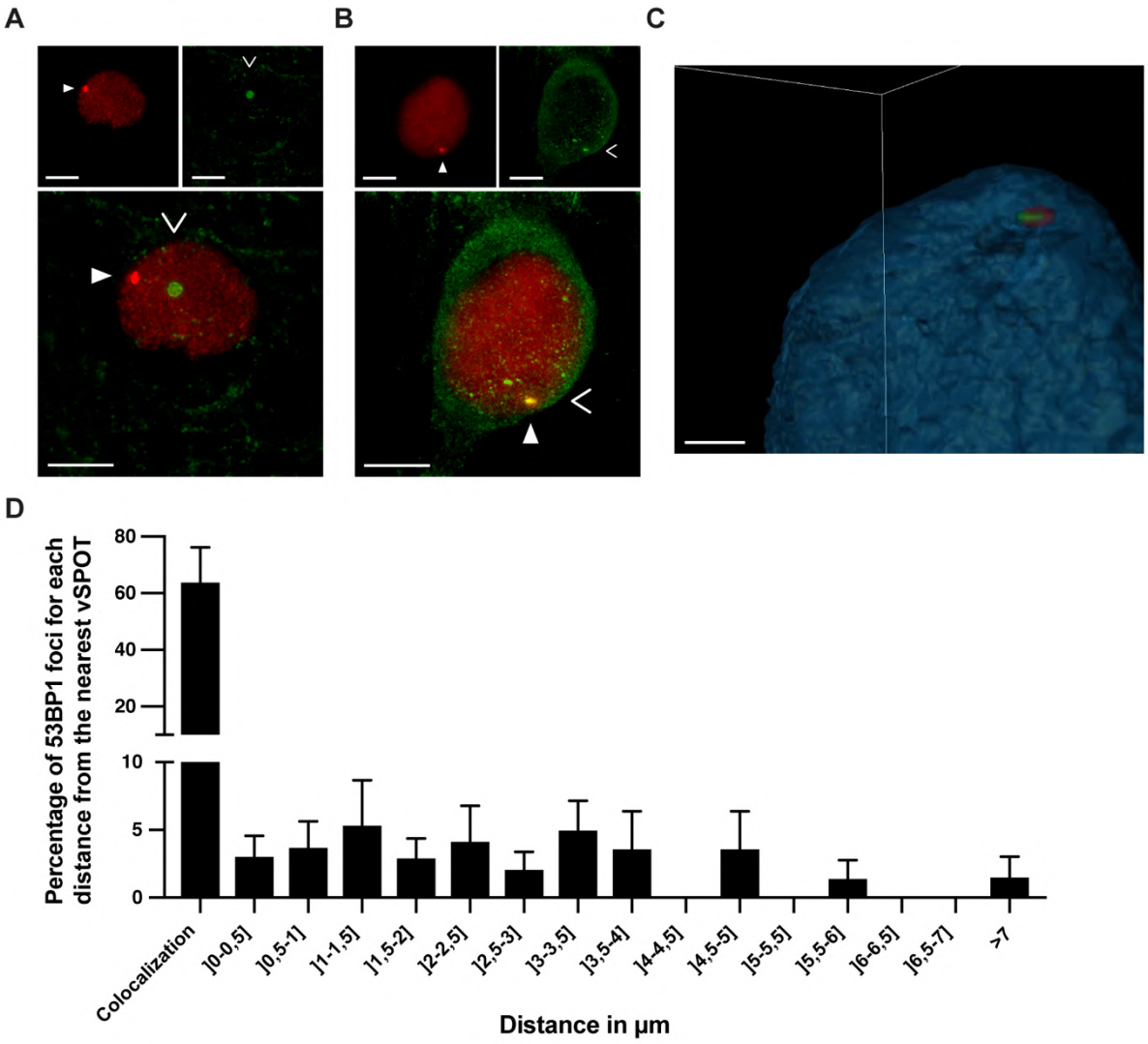
Figure 6: Intrinsic spontaneous neuronal activity is lowered by BoDV-1 infection. Primary cultures of rat neurons were grown on nanoelectrode arrays allowing single-cell recordings from 60 nano-electrodes at 16 dpi. **A)** A neuron cell body and its neurites (green) contacting a nano-electrode (magenta) is shown as observed at high magnification by electron microscopy. Scale bar: 10 μm. **B)** Spontaneous neuronal activity was recorded for 3 minutes every 15 minutes, 5-6 times for each electrode. Representative traces for NI and BoDV-1-infected neurons are shown. Each arrow shows a peak above the amplitude threshold of intrinsic electric activity recorded by the electrode. **C)** The average number of peaks of spontaneous intrinsic activity was automatically counted by a home-made algorithm and represented per minute of recording for BoDV-1-infected vs. non-infected neurons (NI). n = 1 well per condition from 3 independent experiments. ****p<0.0001 *vs.* NI by unpaired *t*-test. Bars represent means ± SEM.

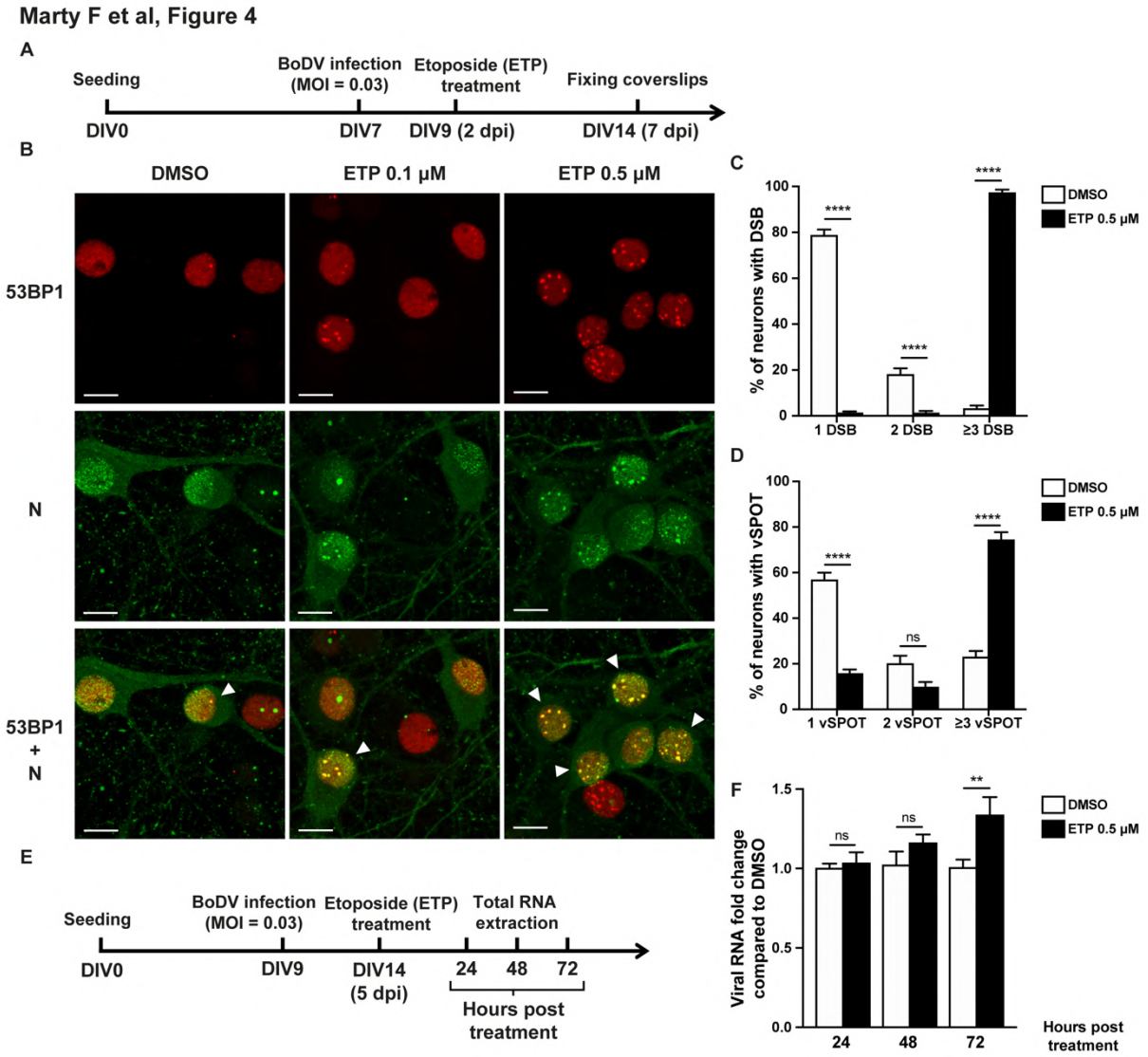
Marty F et al, Figure 1

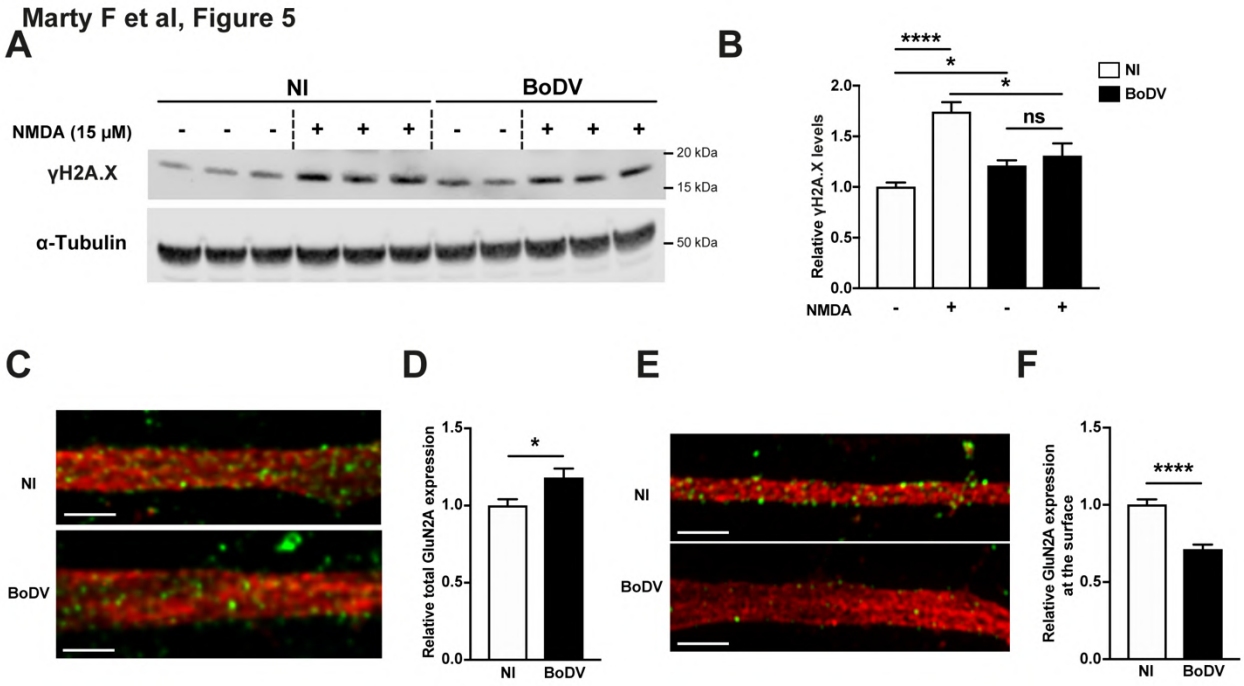



Marty F et al, Figure 2
A
Neurons seeding
Transduction by lentiviral vectors
Proteins extraction or fixation
DIV0
DIV7
DIV14 (7 dpt)
B
LV GFP
LV N
LV P
LV X
Transgene
Transgene+53BP1+MAP2
C
Transgene+53BP1+MAP2
D
MOCK
LV GFP
LV N
LV P
γH2A.X
N
P
β-Actin
20 kDa
15 kDa
37 kDa
25 kDa
50 kDa
E
MOCK
LV GFP
LV X
γH2A.X
X
β-Actin
20 kDa
15 kDa
50 kDa
37 kDa
F
ns
**
***
Relative γH2A.X levels
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MOCK
LV GFP
LV N
LV P
LV X

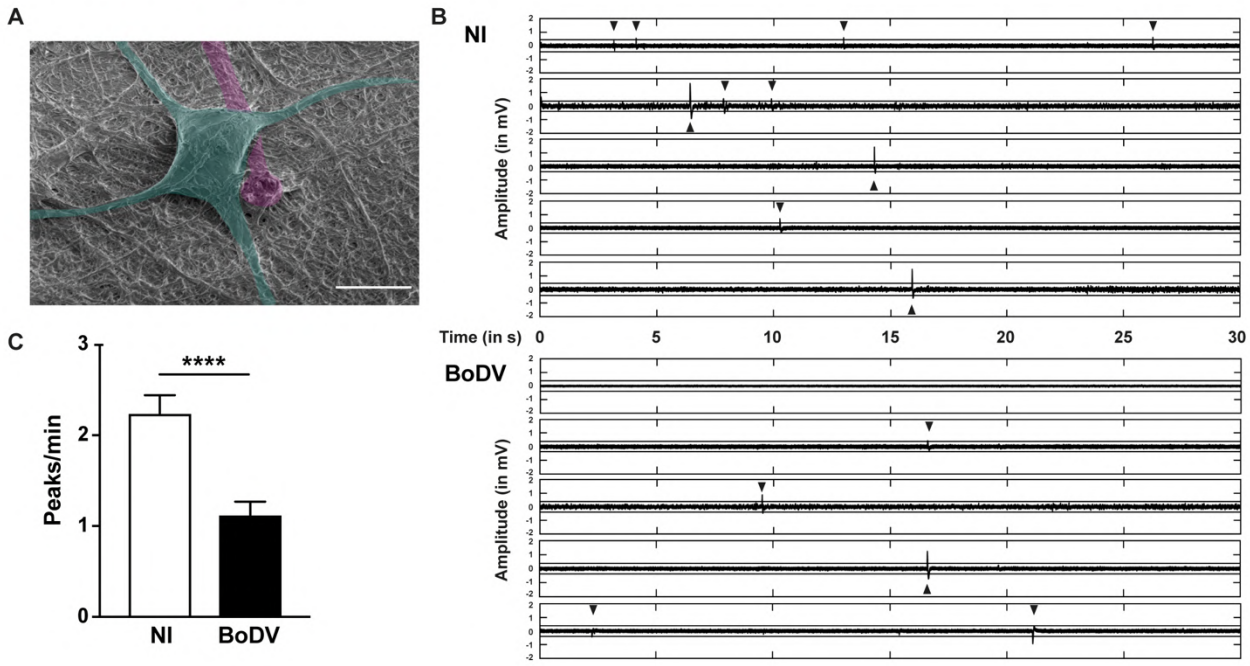
Marty F et al, Figure 3




Marty F et al, Figure 4
A
Seeding
BoDV infection (MOI = 0.03)
Etoposide (ETP) treatment
Fixing coverslips
DIV0
DIV7
DIV9 (2 dpi)
DIV14 (7 dpi)
B
DMSO
ETP 0.1 µM
ETP 0.5 µM
53BP1
N
53BP1 + N
C
% of neurons with DSB
1 DSB
2 DSB
≥3 DSB
DMSO
ETP 0.5 µM
D
% of neurons with vSPOT
1 vSPOT
2 vSPOT
≥3 vSPOT
ns
E
Seeding
BoDV infection (MOI = 0.03)
Etoposide (ETP) treatment
Total RNA extraction
DIV0
DIV9
DIV14 (5 dpi)
24
48
72
Hours post treatment
F
Viral RNA fold change compared to DMSO
Hours post treatment


Marty F et al, Figure 5
A
NI
BoDV
NMDA (15 µM)
- - - + + + - - + + +
γH2A.X
α-Tubulin
20 kDa
15 kDa
50 kDa
B
****
*
*
ns
NI
BoDV
Relative γH2A.X levels
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NMDA - + - +
C
NI
BoDV
D
Relative total GluN2A expression
1.5
1.0
0.5
0.0
*
NI
BoDV
E
NI
BoDV
F
Relative GluN2A expression at the surface
1.5
1.0
0.5
0.0
****
NI
BoDV

Marty, F. et al, Figure 6



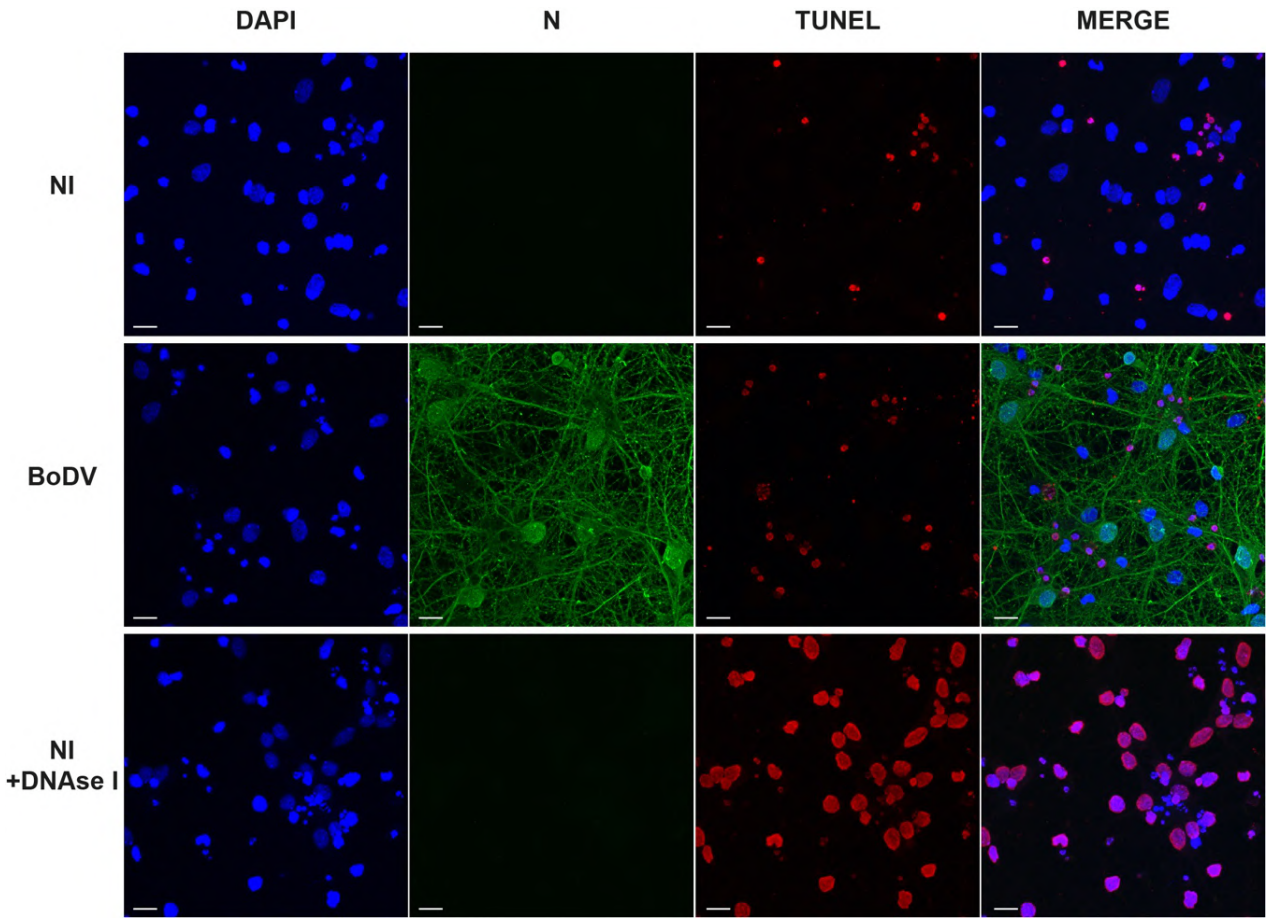
TABLE

Table 1. Active electrode in infected or non-infected neurons

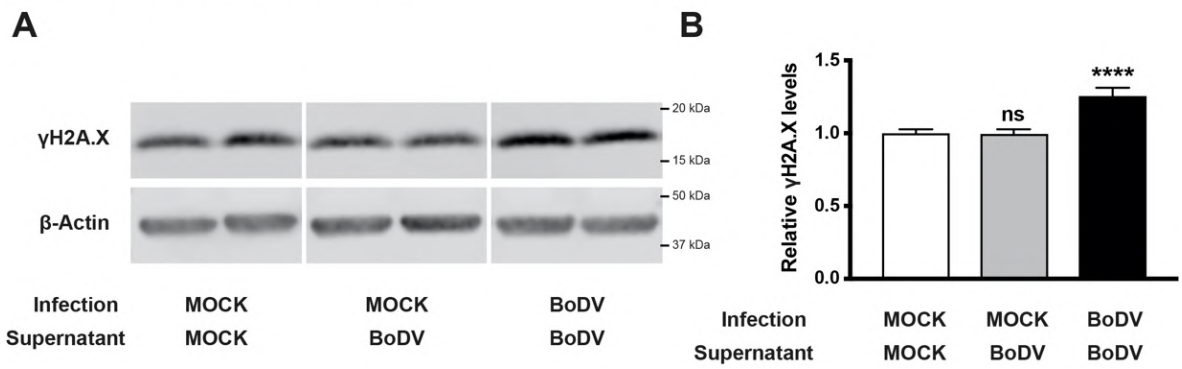
	NI	BoDV-1	Ratio BoDV-1/NI
Experiment 1	50.0% (n = 58)	39.7% (n = 58)	0.794
Experiment 2	90.7% (n = 54)	63.8% (n = 58)	0.703
Experiment 3	88.9% (n = 54)	68.4% (n = 57)	0.769
Mean ± SD	77.1% ± 23.6	57.3% ± 15.4	**0.755 ± 0.047 ***

For each experiment, active electrodes are expressed as percentage of total electrodes included (n). The mean (in bold) of the ratios is compared to a theoretical value of 1 (no difference between NI and BoDV-1) by one sample *t*-test, *$p<0.05$. n = 3 independent experiments.

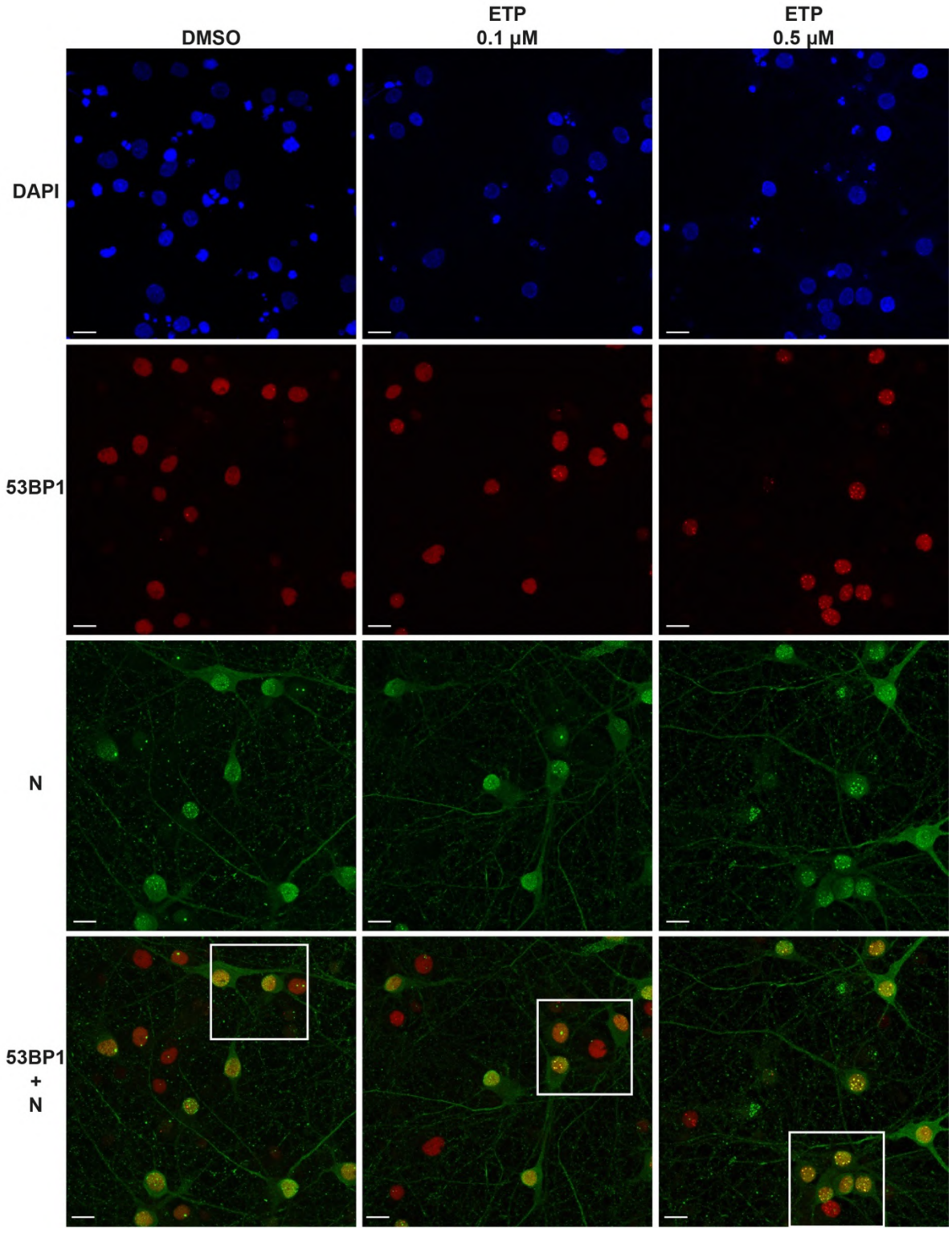
SUPPLEMENTARY FIGURES



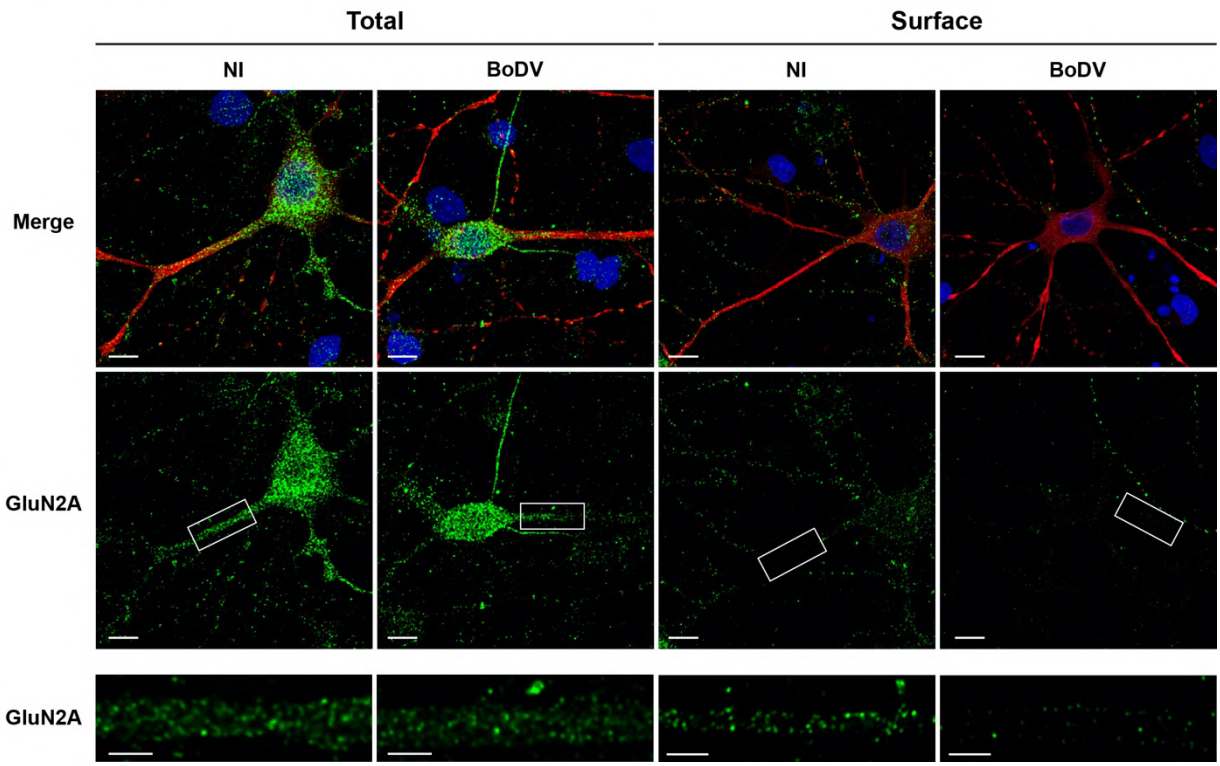
Supplementary Figure 1: BoDV infection of hippocampal neurons does not lead to neuronal apoptosis.
Primary neurons were infected (BoDV) or not (NI) at 1DIV. At 13 dpi cells were fixed and TUNEL assay was performed (in red). Nucleoprotein (N, in green) and nuclei (DAPI, blue) were stained. As a positive control, a non-infected culture was treated by DNase I prior to TUNEL assay for positive staining. Fields were visualized by confocal microscopy. A representative micrograph for each condition is shown. Scale bar: 20 μm.



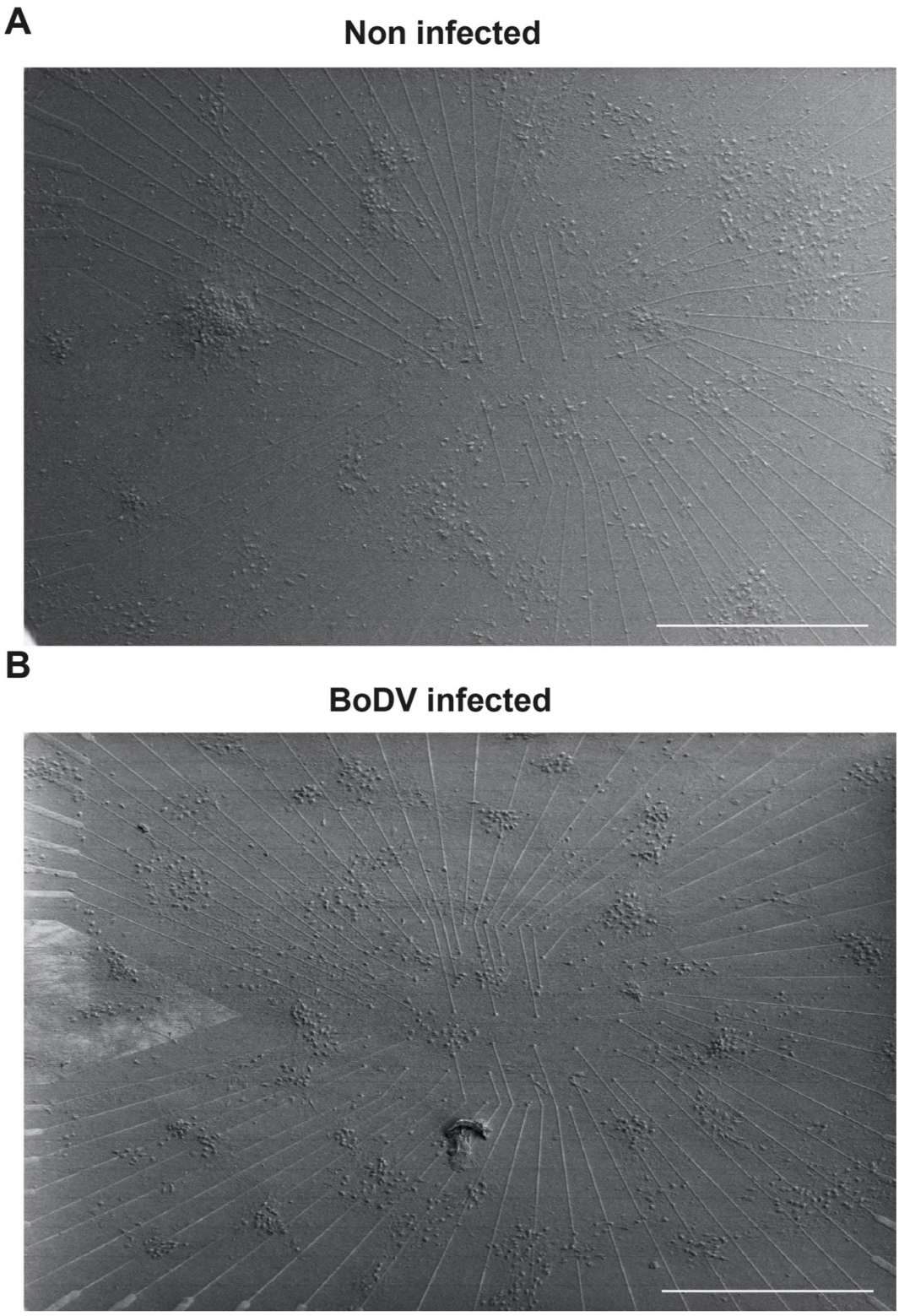
Supplementary Figure 2: BoDV-induced increase in DSB levels is not related to components released in the culture medium.
Primary neurons were infected (BoDV) or not (mock) at 1DIV. At 13 dpi, supernatant obtained from filtered medium from infected and non-infected wells were swapped. 5 hours later, levels of the DSB marker γH2A.X were determined by Western blotting. **A)** A representative Western blot. Each band represents the signal for a biological replicate. All bands were part of one experiment blotted on the same membrane. **B**) Quantitation of Western blot signals. The average γH2A.X to β-actin ratio in non-infected cultures with mock supernatant was defined as 1.0. n = 2-3 wells per condition from 8 independent experiments. ****$p<0.0001$ vs. mock by Dunnett post-hoc t-test. Bars represent means ± SEM.



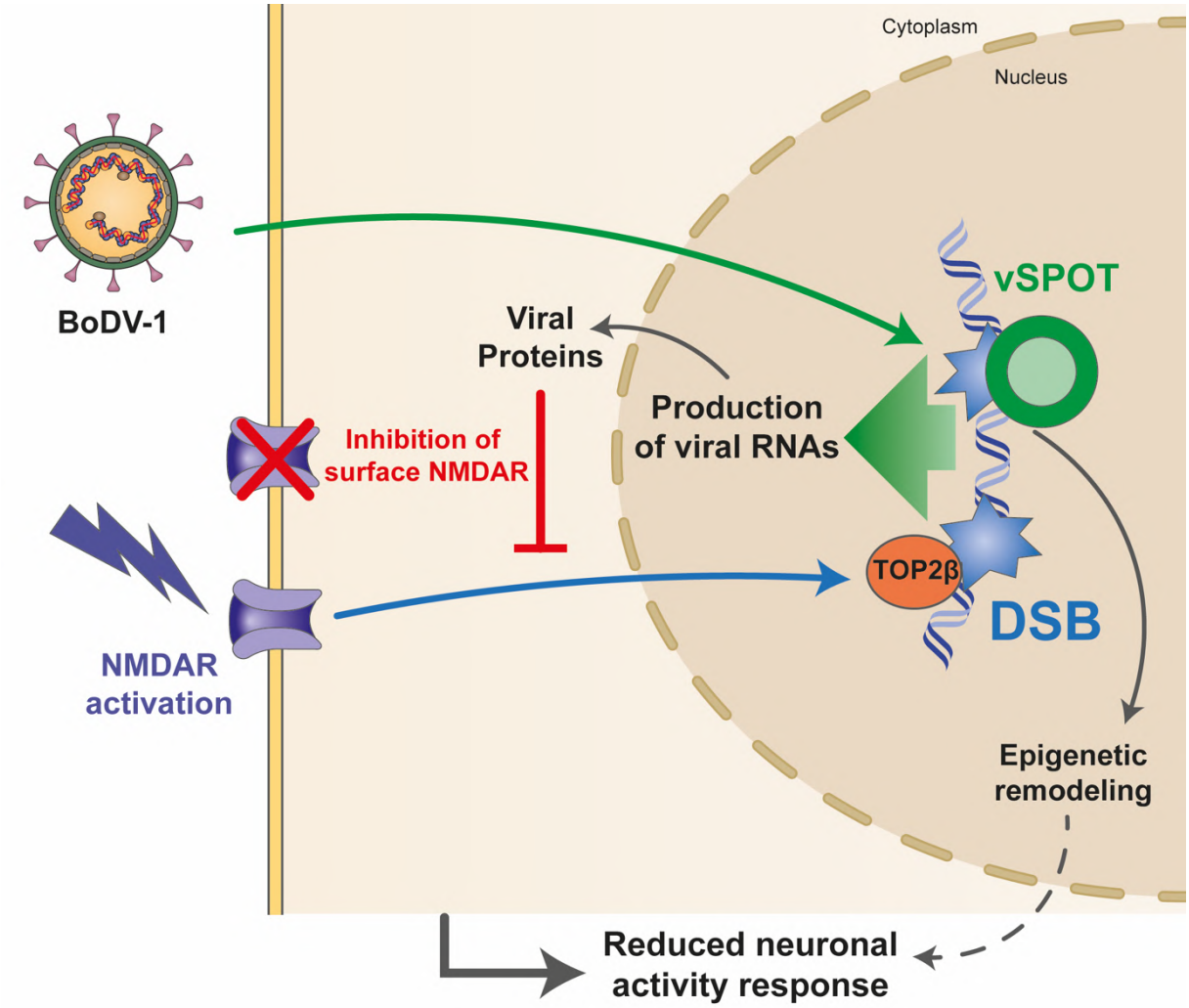
Supplementary Figure 3: Induction of DSB in neurons by etoposide increases numbers of colocalized DSB/vSPOT per neuron and the replication of viral RNA.
General views of the fields of BoDV-1 infected neurons, after treatment with DSB-inducing agent etoposide (ETP) or its vehicle DMSO, and by confocal microscopy: 53BP1-positive foci of DSB (in red), and Nucleoprotein-positive (N) vSPOT (in green), DAPI in blue. White frames highlight the insets shown at higher magnification in Figure 4. Scale bar: 10 µm.



Supplementary Figure 4: General view of total and surface expression of GluN2A subunits of NMDARs in non-infected *vs.* infected neurons.
Total (left) and surface (right) expression of GluN2A subunit of NMDARs were quantified by immunofluorescence staining followed by confocal microscopy analysis. Representative confocal micrographs are shown of total and surface GluN2A signals (in green) in dendrites (MAP2, red) from BoDV *vs.* non-infected (NI) neurons at 16DIV. Scale bar: 10 μm. These images were acquired after acquiring the zoomed dendrite images. The white insets indicate the positions of higher magnification and higher resolution images of GluN2A staining of dendrites shown in the lower part of the figure. Scale bar: 2 μm.



Supplementary Figure 5: BoDV-1 infection has no impact on the general architecture of neuronal networks spread on nanochips.
Primary cultures of rat neurons were grown on nanochips devices allowing single cell level recordings by 60 nano-electrodes. 16 dpi, non-infected (NI) **(A)** or BoDV-1-infected (BoDV) **(B)** culture networks were visualized by Scanning Electronic Microscopy. Scale bar: 500 μm.



Supplementary Figure 6: Schematic view of the putative crosstalk between persistence of BoDV-1 and neuronal function, through the control of DSB levels. Schematic representation of principal findings highlighting raising the hypothesis of the central role of DSB control by BoDV1 to regulate its replication to the benefit of lifelong persistence but to the detriment of neuronal function. TOP2β, Topoisomerase 2β.

Supplementary video 1: Visualization of colocalized 53BP1-positive DSB foci and vSPOT in the nucleus of a BoDV-infected neuron. 53BP1 in magenta, BoDV-N in green.

REFERENCES

Akbarian, S., Beeri, M.S., and Haroutunian, V. (2013). Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. JAMA neurology *70*, 711-718.

Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. Cell *152*, 417-429.

Anderson, L., Henderson, C., and Adachi, Y. (2001). Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. Molecular and cellular biology *21*, 1719-1729.

Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. Nature reviews Genetics *14*, 794-806.

Bednarski, J.J., and Sleckman, B.P. (2019). At the intersection of DNA damage and immune responses. Nat Rev Immunol *19*, 231-242.

Betourne, A., Szelechowski, M., Thouard, A., Abrial, E., Jean, A., Zaidi, F., Foret, C., Bonnaud, E.M., Charlier, C.M., Suberbielle, E., *et al.* (2018). Hippocampal expression of a virus-derived protein impairs memory in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *115*, 1611-1616.

Bonnaud, E.M., Suberbielle, E., and Malnou, C.E. (2016). Histone acetylation in neuronal (dys)function. Biomol Concepts *7*, 103-116.

Bonnaud, E.M., Szelechowski, M., Betourne, A., Foret, C., Thouard, A., Gonzalez-Dunia, D., and Malnou, C.E. (2015). Borna disease virus phosphoprotein modulates epigenetic signaling in neurons to control viral replication. Journal of virology *89*, 5996-6008.

Casanova, A., Bettamin, L., Blatche, M.C., Mathieu, F., Martin, H., Gonzalez-Dunia, D., Nicu, L., and Larrieu, G. (2018). Nanowire based bioprobes for electrical monitoring of electrogenic cells. J Phys Condens Matter *30*, 464001.

Chen, T.I., Hsu, Y.K., Chou, C.Y., Chen, Y.H., Hsu, S.T., Liou, Y.S., Dai, Y.C., Chang, M.F., and Chang, S.C. (2019). Hepatitis C Virus NS3 Protein Plays a Dual Role in WRN-Mediated Repair of Nonhomologous End Joining. Journal of virology *93*.

Chevalier, G., Suberbielle, E., Monnet, C., Duplan, V., Martin-Blondel, G., Farrugia, F., Le Masson, G., Liblau, R., and Gonzalez-Dunia, D. (2011). Neurons are MHC class I-dependent targets for CD8 T cells upon neurotropic viral infection. PLoS pathogens *7*, e1002393.

Crowe, S.L., Movsesyan, V.A., Jorgensen, T.J., and Kondratyev, A. (2006). Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation. Eur J Neurosci *23*, 2351-2361.

Cubitt, B., and de la Torre, J.C. (1994). Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. Journal of virology *68*, 1371-1381.

Day, J.J., and Sweatt, J.D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. Neuron *70*, 813–829.

Enokido, Y., Yoshitake, A., Ito, H., and Okazawa, H. (2008). Age-dependent change of HMGB1 and DNA double-strand break accumulation in mouse brain. Biochem Biophys Res Commun *376*, 128-133.

Ferre, C.A., Davezac, N., Thouard, A., Peyrin, J.M., Belenguer, P., Miquel, M.C., Gonzalez-Dunia, D., and Szelechowski, M. (2016). Manipulation of the N-terminal sequence of the Borna disease virus X protein improves its mitochondrial targeting and neuroprotective potential.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *30*, 1523-1533.

Finck, T., Liesche-Starnecker, F., Probst, M., Bette, S., Ruf, V., Wendl, C., Dorn, F., Angstwurm, K., Schlegel, J., Zimmer, C., *et al.* (2020). Bornavirus Encephalitis Shows a Characteristic Magnetic Resonance Phenotype in Humans. Ann Neurol *88*, 723-735.

Galvan, S.C., Garcia Carranca, A., Song, J., and Recillas-Targa, F. (2015). Epigenetics and animal virus infections. Front Genet *6*, 48.

Gonzalez-Dunia, D., Eddleston, M., Mackman, N., Carbone, K., and de la Torre, J.C. (1996). Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with borna disease virus. Journal of virology *70*, 5812-5820.

Hammack, C., Ogden, S.C., Madden, J.C., Jr., Medina, A., Xu, C., Phillips, E., Son, Y., Cone, A., Giovinazzi, S., Didier, R.A., *et al.* (2019). Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. Journal of virology *93*.

Hans, A., Bajramovic, J.J., Syan, S., Perret, E., Dunia, I., Brahic, M., and Gonzalez-Dunia, D. (2004). Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *18*, 863-865.

Hirai, Y., Hirano, Y., Matsuda, A., Hiraoka, Y., Honda, T., and Tomonaga, K. (2016). Borna Disease Virus Assembles Porous Cage-like Viral Factories in the Nucleus. The Journal of biological chemistry *291*, 25789-25798.

Hristova, D.B., Lauer, K.B., and Ferguson, B.J. (2020). Viral interactions with non-homologous end-joining: a game of hide-and-seek. J Gen Virol.

Hu, H.L., Shiflett, L.A., Kobayashi, M., Chao, M.V., Wilson, A.C., Mohr, I., and Huang, T.T. (2019). TOP2beta-Dependent Nuclear DNA Damage Shapes Extracellular Growth Factor Responses via Dynamic AKT Phosphorylation to Control Virus Latency. Molecular cell *74*, 466-480 e464.

Jie, J., Xu, X., Xia, J., Tu, Z., Guo, Y., Li, C., Zhang, X., Wang, H., Song, W., and Xie, P. (2018). Memory Impairment Induced by Borna Disease Virus 1 Infection is Associated with Reduced H3K9 Acetylation. Cell Physiol Biochem *49*, 381-394.

Khanna, M., Ray, A., Rawall, S., Chandna, S., Kumar, B., and Vijayan, V.K. (2010). Detection of influenza virus induced ultrastructural changes and DNA damage. Indian J Virol *21*, 50-55.

Korn, K., Coras, R., Bobinger, T., Herzog, S.M., Lucking, H., Stohr, R., Huttner, H.B., Hartmann, A., and Ensser, A. (2018). Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. N Engl J Med *379*, 1375-1377.

Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y. (2013). DNA damage enhances integration of HIV-1 into macrophages by overcoming integrase inhibition. Retrovirology *10*, 21.

Lange, U.C., Verdikt, R., Ait-Ammar, A., and Van Lint, C. (2020). Epigenetic crosstalk in chronic infection with HIV-1. Semin Immunopathol *42*, 187-200.

Lathe, R., and St Clair, D. (2020). From conifers to cognition: Microbes, brain and behavior. Genes, brain, and behavior, e12680.

Lau, C.G., Takayasu, Y., Rodenas-Ruano, A., Paternain, A.V., Lerma, J., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2010). SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA

receptor trafficking. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *30*, 242-254.

Ledur, P.F., Karmirian, K., Pedrosa, C., Souza, L.R.Q., Assis-de-Lemos, G., Martins, T.M., Ferreira, J., de Azevedo Reis, G.F., Silva, E.S., Silva, D., *et al.* (2020). Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. Sci Rep *10*, 1218.

Li, N., Parrish, M., Chan, T.K., Yin, L., Rai, P., Yoshiyuki, Y., Abolhassani, N., Tan, K.B., Kiraly, O., Chow, V.T., *et al.* (2015). Influenza infection induces host DNA damage and dynamic DNA damage responses during tissue regeneration. Cellular and molecular life sciences : CMLS *72*, 2973-2988.

Luftig, M.A. (2014). Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. Annu Rev Virol *1*, 605-625.

Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A.R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T.X., Yamakawa, H., Pao, P.C., *et al.* (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. Cell *161*, 1592-1605.

Mandke, P., and Vasquez, K.M. (2019). Interactions of high mobility group box protein 1 (HMGB1) with nucleic acids: Implications in DNA repair and immune responses. DNA Repair (Amst) *83*, 102701.

Mansuy, J.M., Suberbielle, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., Delobel, P., Gonzalez-Dunia, D., Malnou, C.E., Izopet, J., *et al.* (2016). Zika virus in semen and spermatozoa. Lancet Infect Dis *16*, 1106-1107.

Mao, K., and Zhang, G. (2021). The role of PARP1 in neurodegenerative diseases and aging. FEBS J.

Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Daito, T., Horie, M., Ikuta, K., Fujino, K., Nakamura, S., Schneider, U., *et al.* (2012). Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. Cell host & microbe *11*, 492-503.

Mourão Diego, C.S., Schaefer Uwe , Bozzacco Leonia, Carneiro Leticia A., Gerber Alan, Adura Carolina , Dill Brian D., Molina Henrik, Carroll Thomas, Paul Matthew, Bhanu Natarajan V., Garcia Benjamin A., Joberty Gerard, Rioja Inmaculada, Prinjha Rab K., Roeder Robert G., Rice Charles M., MacDonald Margaret R., Patel Dinshaw, Tarakhovsky Alexander (2020). A histone-like motif in yellow fever virus contributes to viral replication. bioRxiv *2020.05.05.078782*.

Niller, H.H., Angstwurm, K., Rubbenstroth, D., Schlottau, K., Ebinger, A., Giese, S., Wunderlich, S., Banas, B., Forth, L.F., Hoffmann, D., *et al.* (2020). Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. Lancet Infect Dis *20*, 467-477.

Patra, T., Meyer, K., Ray, R.B., and Ray, R. (2020). Hepatitis C Virus Mediated Inhibition of miR-181c Activates ATM Signaling and Promotes Hepatocyte Growth. Hepatology *71*, 780-793.

Piekna-Przybylska, D., Sharma, G., Maggirwar, S.B., and Bambara, R.A. (2017). Deficiency in DNA damage response, a new characteristic of cells infected with latent HIV-1. Cell Cycle *16*, 968-978.

Ryan, E.L., Hollingworth, R., and Grand, R.J. (2016). Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. Biomolecules *6*, 2.

Schlottau, K., Forth, L., Angstwurm, K., Hoper, D., Zecher, D., Liesche, F., Hoffmann, B., Kegel, V., Seehofer, D., Platen, S., *et al.* (2018). Fatal Encephalitic Borna Disease Virus 1 in Solid-Organ Transplant Recipients. N Engl J Med *379*, 1377-1379.

Schmid, S., Metz, P., Prat, C.M., Gonzalez-Dunia, D., and Schwemmle, M. (2010). Protein kinase C-dependent phosphorylation of Borna disease virus P protein is required for efficient viral spread. Arch Virol *155*, 789-793.

Skalka, A.M., and Katz, R.A. (2005). Retroviral DNA integration and the DNA damage response. Cell Death Differ *12 Suppl 1*, 971-978.

Suberbielle, E., Djukic, B., Evans, M., Kim, D.H., Taneja, P., Wang, X., Finucane, M., Knox, J., Ho, K., Devidze, N., *et al.* (2015). DNA repair factor BRCA1 depletion occurs in Alzheimer brains and impairs cognitive function in mice. Nat Commun *6*, 8897.

Suberbielle, E., Sanchez, P.E., Kravitz, A.V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A.C., and Mucke, L. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta. Nature neuroscience *16*, 613-621.

Suberbielle, E., Stella, A., Pont, F., Monnet, C., Mouton, E., Lamouroux, L., Monsarrat, B., and Gonzalez-Dunia, D. (2008). Proteomic analysis reveals selective impediment of neuronal remodeling upon Borna disease virus infection. Journal of virology *82*, 12265-12279.

Torres, G., Leheste, J.R., and Ramos, R.L. (2015). Immunocytochemical localization of DNA double-strand breaks in human and rat brains. Neuroscience *290*, 196-203.

Tsai, K., and Cullen, B.R. (2020). Epigenetic and epitranscriptomic regulation of viral replication. Nature reviews Microbiology *18*, 559-570.

van den Berg, J., A, G.M., Kielbassa, K., Feringa, F.M., Freire, R., and Medema, R.H. (2018). A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression. Nucleic Acids Res *46*, 10132-10144.

Vieira, M., Yong, X.L.H., Roche, K.W., and Anggono, V. (2020). Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits. J Neurochem *154*, 121-143.

Volmer, R., Monnet, C., and Gonzalez-Dunia, D. (2006). Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. PLoS pathogens *2*, e19.

Weitzman, M.D., and Fradet-Turcotte, A. (2018). Virus DNA Replication and the Host DNA Damage Response. Annu Rev Virol *5*, 141-164.

Wyllie, D.J., Livesey, M.R., and Hardingham, G.E. (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. Neuropharmacology *74*, 4-17.

II. ROLES ET PERTURBATIONS DES CASSURES DOUBLE-BRIN DANS LES TROUBLES DU COMPORTEMENT ASSOCIES A L'INFUSION CHRONIQUE D'IL-1β

Dans cette deuxième partie de mon projet, nous avons étudié l'impact d'un traitement chronique par de l'IL-1β sur le comportement, chez la souris. Aussi nous voulions étudier le lien d'éventuelles perturbations du comportement avec une altération des mécanismes impliquant les CDB.

La mise en place de ce projet a nécessité de construire de 0 un espace dédié aux expériences de comportement dans notre zootechnie car aucune expérience de comportement n'était réalisée à l'institut. Notre premier résultat a donc été d'apporter à l'institut un savoir-faire et des procédures, de concevoir des dispositifs pour permettre de développer des approches expérimentales utilisant des tests comportementaux.

Les résultats que nous avons obtenus ont donc permis de mettre en évidence pour la première fois qu'un traitement chronique par de l'IL-1β n'avait pas d'impact sur la mémoire générale mais conduisait à des troubles de la mémoire hippocampo-dépendante, avec le test du NPR, sans neuroinflammation massive associée. En effet, dans ces conditions, nous n'avons pas observé d'anxiété, de prostration ou de troubles de la mobilité avec le test de l'EPM. Aussi, la numération des populations gliales n'a pas révélé d'astrocytose ou de microgliose dans l'hippocampe, tout comme nous n'y avons pas observé d'altération de la neurogenèse. De façon intéressante, nous avons découvert que les souris traitées par de l'IL-1β avaient plus de neurones avec des CDB dans les régions de l'hippocampe.

Afin de déterminer la spécificité de la signalisation de l'IL-1β dans les troubles de la mémoire observés, nous avons utilisé un modèle original qui n'a encore jamais été publié qui nous permet d'induire la délétion du gène codant l'IL-1R1 spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe. Grâce à ce modèle, nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant que, la délétion du gène est suffisante pour prévenir les troubles de la mémoire chez des souris traitées par de l'IL-1β. Ainsi, il y aurait un effet direct de l'IL-1β sur les neurones excitateurs de l'hippocampe qui altérerait la mémoire spatiale.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'implication des CDB induites par le traitement par de l'IL-1β dans les troubles de la mémoire observés. De la même façon que pour la question, nous avons utilisé variante du modèle que nous avons mis au point pour la délétion de l'IL-1R1 mais cette fois-ci pour induire la délétion de H2A.X spécifiquement dans

les neurones. En effet, il n'est pour l'instant pas possible techniquement de prévenir la génération d'une CDB, alors nous avons utilisé une approche qui permet de supprimer la signalisation induite par la détection de la CDB *via* la phosphorylation de H2A.X. Nous avons alors découvert que, la délétion de H2A.X dans les neurones excitateurs de l'hippocampe serait suffisante pour prévenir les troubles de la mémoire chez des souris traitées par de l'IL-1β. Ainsi, nous avons pour la première fois mis en évidence l'implication de la signalisation des CDB dans des troubles de la mémoire spatiale, associées à un traitement chronique par de l'IL-1β.

Finalement, nous avons pu mettre en évidence qu'un traitement chronique par de l'IL-1β conduisant à des troubles de la mémoire spatiale sans neuroinflammation massive apparente. Aussi, grâce à l'utilisation de modèles originaux, nous avons pour la première fois soulever l'importance de la signalisation dépendante de l'IL-1R1 mais également de la signalisaiton induite par les CDB, spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe, dans l'altération de la mémoire après un traitement chronique par de l'IL-1β. Ces découvertes ouvrent donc la voie à un domaine d'étude des CDB en conditions pathologique, qui peut permettre à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. *Analyses comportementales après traitement chronique à l'IL-1β*

Animaux

Durant mes travaux de thèse, nous avons utilisé trois modèles de souris mâles âgés de 4 à 5 mois. Des souris sauvages C57BL6/J (Charles River), des souris transgéniques de la lignée H2a.x$^{fl/fl}$ - CaMKII-CRE-ERT2 (croisement des lignées simple transgéniques obtenues par MTA de, respectivement GIE-CERBM pour Gunther Schutz et de Frederick Alt (Erdmann *et al.*, 2007; Celeste *et al.*, 2002)) et des souris transgéniques de la lignée Il-1r1$^{fl/fl}$ - CaMKII-CRE-ERT2 (IL-1R1 flox donnée avec MTA avec Ari Waisman (Abdulaal *et al.*, 2016)) de fond génétique pur C57BL6/J. Les animaux expriment la CRE *recombinase* (CRE) sous le contrôle du promoteur de CaMKIIα (*Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II alpha*) qui est un gène majoritairement et fortement exprimé dans les neurones excitateurs de l'hippocampe après la naissance (Wang *et al.*, 2013).

Les souris sont hébergées en groupe avec au minimum deux individus par cage, avec des mesures d'enrichissement, dans un environnement au cycle normal jour : nuit, 12 h : 12 h (les lumières s'allument à 7 h) et dont la température est contrôlée (22 °C ± 1 °C). L'eau et la nourriture sont disponibles à volonté. Toutes les expériences sur les souris ont été approuvées par le Ministère et le comité d'Éthique CE2A122 selon les protocoles (#6483 2016072516333164 V3 et #14514-2018060113422025 V2), en accord avec les articles R.214-87 et R.214-126 du code rural et de la pêche maritime.

Induction de la délétion du gène floxé dans les souris transgéniques

Pour induire la délétion du gène d'intérêt, les lignées transgéniques ont été traitées quotidiennement par injection intrapéritonéale à raison de 0,1 mg/g/jour de tamoxifène, subdivisé en deux injections par jour, pendant 5 jours. La préparation huileuse de tamoxifène (Sigma-Aldrich) est préparée dans de l'huile de maïs stérile (Sigma-Aldrich). Les souris contrôles qui n'ont pas la construction CaMKII-CRE-ERT2 mais le gène d'intérêt « floxé », sont également traitées par le tamoxifène. Les souris sont ensuite laissées pendant un mois, un temps nécessaire pour s'assurer que les protéines déjà traduites aient été éliminées du fait de leur demi-vie (12 à 14 jours pour H2A.X , comparé à quelques heures pour IL-1R1 (Rachdaoui *et al.*, 2017; Fields *et al.*, 2019) (Figure 1). Par la suite, les souris déficientes en H2A.X seront

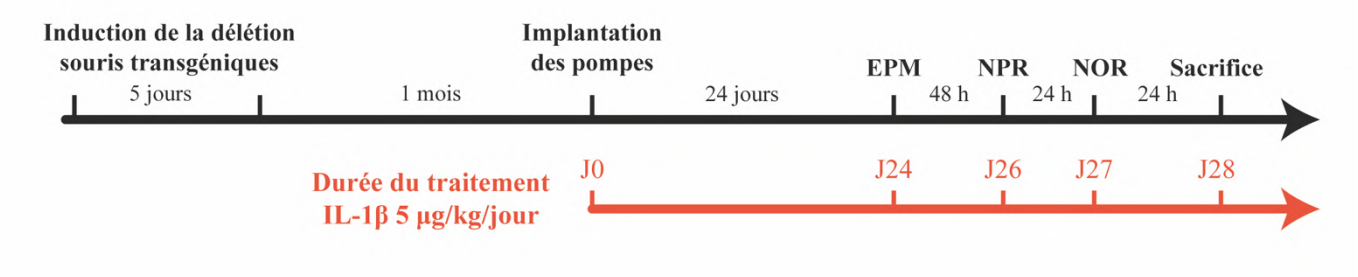


Figure 35 : Programme général de l'organisation des expériences chez l'animal.

appelées iH2A.X KO (*induced* H2A.X *knock-out*) et les souris déficientes pour IL-1R1, iIL-1R1 KO (*induced* IL-1R1 *knock out*).

Infusion chronique par implantation de mini-pompes osmotiques

24 h avant le début du traitement des souris, les mini-pompes osmotiques (model 2004, Alzet) sont remplies avec une solution saline 0,9 % complétée avec de la BSA (*bovine serum albumin*) utilisée comme protéine porteuse à 0,1 % ou une solution d'IL-1β recombinante de souris (rmIL-1β) (Immunotools) reconstituée dans une solution saline. (NaCl) 0,9 %-BSA 0,1 %. Selon les recommandations du fabricant, les pompes IL-1β sont remplies de façon à ce que les souris reçoivent une dose de 5 µg/kg/jour.

Le jour de la chirurgie, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de 250 mg/kg d'Avertine (Tribromoéthanol, ThermoFisher Scientific). Elles reçoivent également pré- et en post-opératoire 0,05 mg/kg d'analgésique morphinique, la buprénorphine (AnimalCare). Les souris sont épilées entre les deux omoplates pour réaliser une incision et créer une poche sous-cutanée. La pompe est ensuite insérée dans la poche puis l'incision est suturée. Les souris sont traitées pendant 24 jours avant le début des tests comportementaux (Figure 35). Le poids des souris est suivi tout le long de l'expérimentation une semaine avant implantation et sur plusieurs jours après implantation par pesée.

Tests comportementaux

Après 24 jours de traitement, les souris sont soumises à trois tests comportementaux afin d'évaluer : leur niveau d'anxiété avec l'EPM et la mémoire hippocampo- ou non hippocampo-dépendante avec respectivement le NPR et le NOR. Le programme chronologique d'organisation des tests que nous avons adopté est présenté sur les Figures 35 et 36A. Avant chaque séance de comportement, les souris sont placées dans la suite comportementale 1 h avant le début des expériences pour les familiariser à l'ambiance de la pièce. La pièce de comportement comporte sur ses murs des éléments visuels permettant aux souris de se repérer dans l'espace.

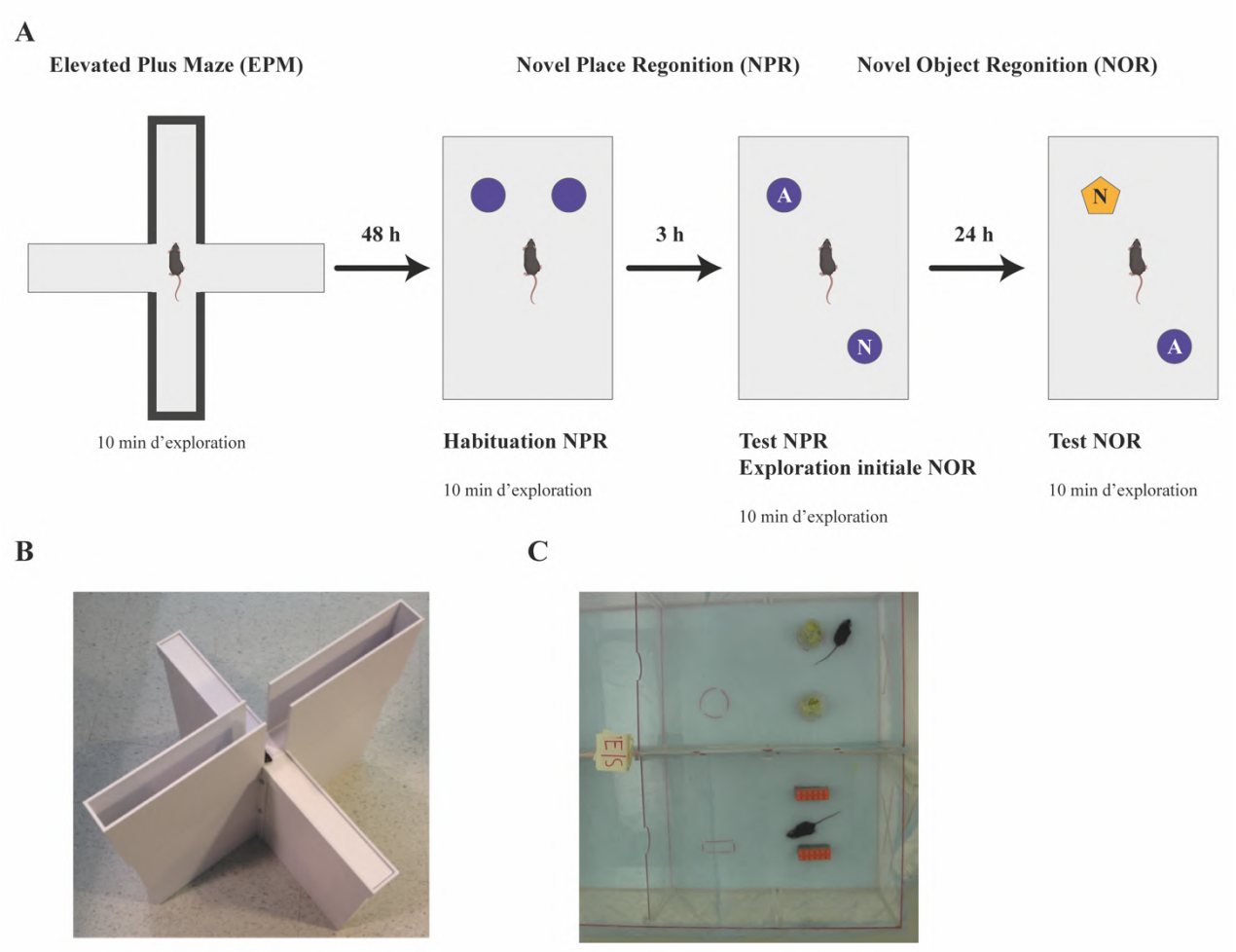


Figure 36 : Présentation des tests comportementaux utilisés pour évaluer l'anxiété et la mémoire des souris traitées.

(A) Programme de l'organisation des tests comportementaux. Le design des expériences fait que la phase de test NPR correspond également à la phase de première exploration des objets identiques pour le NOR dont la phase de test est réalisée 24 h après. A = « objet non déplacé ou inchangé », N = « nouvel objet ». **(B)** Photographie d'un dispositif EPM similaire à celui utilisé pour mon projet de thèse. **(C)** Photographie du dispositif pour le NPR et le NOR (ici une capture d'écran d'une phase d'exploration initiale dans le NPR) fabriqué et utilisé au laboratoire. Nous disposons de deux arènes séparées par un élément opaque pour ne pas que les souris se voient.

EPM

Le dispositif EPM (Ugo Basile) se présente comme un labyrinthe en forme de croix fait en plastique/ou en métal opaque, constitué de deux bras opposés dits ouverts car exposés et deux bras opposés dits fermés (car encerclés de murs élevés) connectés par une plateforme centrale, et élevé à environ 60 cm du sol (Figure 36B). Chaque souris est placée au centre du labyrinthe et laissée libre d'explorer la plateforme pendant 10 min (Figure 36A). L'exploration est enregistrée par caméra vidéo et la distance parcourue, le nombre d'entrées dans chaque bras aussi bien que le temps passé dans chaque bras est quantifié automatiquement en utilisant le logiciel *ANY-maze* (Ugo Basile). Une souris est considérée entrée dans un bras lorsque 50 % de la masse détectée de la souris franchit une section.

NPR et NOR

Le NPR permet d'évaluer les capacités de mémorisation spatiale hippocampo-dépendante alors que le NOR, tel qu'il est réalisé ici, permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance qui n'implique pas l'hippocampe (Denninger *et al.*, 2018).

Le NPR et le NOR sont réalisés dans un dispositif fabriqué au laboratoire qui consiste en une cage en plexiglas transparent (60 x 30 x 40 cm) posée sur une surface marquée au sol (Figure 36C).

Pour le NPR, deux objets identiques sont placés dans l'arène. Les souris sont déposées au centre de l'arène et sont laissées libres d'explorer leur environnement et d'interagir avec les objets pendant 10 min, il s'agit de l'étape d'exploration initiale des objets et de la cage d'où le terme « habituation ». 3 h après la familiarisation, un des objets est déplacé (objet N) à l'autre bout de l'arène et les souris sont de nouveau déposées dans l'arène afin d'explorer cet environnement familier où seul un objet a été déplacé pendant 10 min (étape de « test ») (Figure 36A). L'objet non déplacé est appelé (A).

Le NOR est réalisé 24 h après la phase de test du NPR. Par rapport à la configuration de l'étape de test du NPR, l'objet qui n'avait pas été déplacé (objet A), est remplacé par un nouvel objet (objet N) très différent du premier. Ainsi, l'étape de test du NPR correspond à l'étape d'exploration initiale pour le NOR. Les souris sont de nouveau mises dans l'arène pendant 10 min (Figure 34A).

Entre chaque souris, l'arène et les objets sont nettoyés avec de l'éthanol pour enlever les marques olfactives déposées par les souris et d'éventuels excréments. Les étapes de chaque test sont enregistrées par caméra vidéo et le temps passé à explorer chaque objet pour l'étape de test est chronométré manuellement, à l'aide d'un logiciel de *scoring* ANVIL. La distance parcourue

dans l’arène est également quantifiée en utilisant un logiciel codé au sein de notre équipe par Charlotte Paut. Il est considéré comme de « l’exploration » les moments où le museau de la souris pointe en direction de l’objet et est en contact avec ce dernier, avec les quatre pattes au sol. Il est exclu les moments considérés comme du jeu où la souris monte sur l’objet ou met ses pattes sur l’objet. Ce test repose sur un comportement naturel de la souris qui est la détection et la concentration d'exploration sur la nouveauté. Ainsi une souris aura tendance à aller explorer ce qu’elle ne connait pas. On peut alors fixer un seuil à 50 % du temps total d’exploration qui correspond à l'absence de préférence d’objet. Ainsi une souris en bonne santé aura tendance à passer plus de 50 % du temps total d’exploration à explorer l’objet qui a été déplacé ou le nouvel objet.

La phase d'exploration initiale des objets identiques est aussi analysée avec le programme mis au point au laboratoire, ce qui permet de dégager des *heat-map* et de calculer une éventuelle préférence latérale de chaque souris. En effet, cette donnée permet d'exclure un biais de latéralité de la cohorte qui compromettrait le reste de l'étude.

1.2. *Analyse des tissus prélevés chez les souris*

Collecte des échantillons biologiques

A 28 jours (sauf spécifié autrement), les souris subissent une deuxième anesthésie terminale par overdose d'Avertine (500 mg/kg). Un prélèvement de 300 µl de sang intracardiaque est effectué en vue du futur contrôle des niveaux d’IL-1β dans le sang par ELISA. L'exsanguination par perfusion intracardiaque de 0.9% NaCl est alors réalisée avant de procéder au prélèvement du cerveau des animaux. Une coupe longitudinale médiale est réalisée afin de séparer les deux hémisphères. Un hémisphère est mis dans une solution à 4 % de PFA dans du PBS pour fixation pendant 48 h à 4 °C sous agitation pour réaliser des coupes histologiques. L’autre hémisphère est stocké directement à -80 °C pour les analyses ultérieures de protéines ou d’ARNm d’intérêt.

Préparation des coupes de cerveaux et marquages par immunohistochimie ou immunohistofluorescence

Après 48 h de fixation, les hémi-cerveaux sont ensuite lavés dans du PBS 1X pendant 24 h à 4 °C sous agitation. Au préalable, les hémi-cerveaux sont mis dans une solution de sucrose à 30 % dans du PBS 1X à 4 °C jusqu'à saturation du tissu en sucre. Pour la découpe, les hémi-cerveaux sont disposés sur une platine réfrigérée d’un microtome à glissière (Leica SM2010 R)

sur un socle de sucrose à 10 %. Les cerveaux sont disposés « débout » de façon à pouvoir réaliser des coupes coronales. Des coupes de 25 µm d'épaisseur sont réalisées et mises dans du cryoprotectant (30 % glycérol, 30 % éthylène glycol et PBS 1X) pour conservation à -20 °C.

Pour réaliser les marquages immunohistofluorescents, les coupes sont d'abord lavées 4x5 min dans du TBS 1X puis perméabilisées 2x5 min dans du TBS-0,5 % Triton X-100 (Tx). Après rinçage 1x5 min au TBS 1X, les coupes sont mises au four 10 min à 100 °C dans du tampon citrate pH 6 (acide citrique 9,4 mM ; citrate de sodium 41,2 mM ; H2O) chaud pour la procédure de démasquage d'antigène. Après lavage 4x5 min dans du TBS 1X, les coupes sont mises dans une solution de blocage des peroxydases endogènes (3 % peroxyde d'hydrogène, 10 % de méthanol, TBS 1X) pendant 15 min à température ambiante. Les coupes sont ensuite lavées 3x5 min au TBS 1X et 2x5 min au TBS-0,5 % Tx, en alternance, puis bloquées dans une solution de TBS-0,1 % Tween contenant 5 % de BSA et de 5% sérum normal de chèvre (NGS) pendant 1 h à température ambiante. Pour les marquages, les anticorps primaires suivant ont été utilisées : le monoclonal anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) de souris dilué au 1/1000 (Millipore, MAB3402), le polyclonal anti-IBA-1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) de lapin dilué au 1/1000 (WAKO, 019-19741) et le polyclonal anti-53BP1 de lapin dilué au 1/500 (Novus, NB100-304) dans une solution de TBS-Tween 0,1 % contenant 3 % de NGS. Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4 °C. Les coupes sont ensuite lavées 3x15 min au TBS 1X et 2x15 min au TBS-0,1 % Tween, en alternance, puis incubées 2h à température ambiante avec les anticorps secondaires conjugués Alexa- (Alexa Fluor 488, 594, 633, Life technologies) correspondants, dilués au 1/500 dans une solution de TBS-0,1 % Tween contenant 3 % de NGS. Les coupes sont finalement lavées 1x 15 min au TBS 1X, incubées 30 min avec du DAPI dans du TBS 1X pour le marquage nucléaire et ensuite lavées 3x15 min au TBS 1X et 2x15 min au TBS-0,1 % Tween par alternance. Les coupes sont enfin montées sur lame SuperFrost (ThermoFisher Scientific) avec du milieu de montage *ProLong Gold Antifade* (Life technologies) puis recouvertes d'une lamelle en verre, et conservées à 4°C à l'obscurité.

Les comptages des neurones positifs pour un foyer 53BP1 sont réalisés manuellement, directement au microscope à fluorescence Olympus BX41 (objectif 40X). Les comptages sont effectués en discriminant les neurones issus de la corne d'Ammon (CA) et du gyrus denté (GD). Brièvement, 3 coupes coronales réparties sur les régions rostrale, médiane et caudales de l'hippocampes sont prises en compte. Le nombre de neurones présentant au moins un foyer positif pour le marquage 53BP1 est déterminé pour chaque région de l'hippocampe, et la moyenne est obtenue à partir des décomptes sur 3 coupes par CA ou par DG. Les comptages

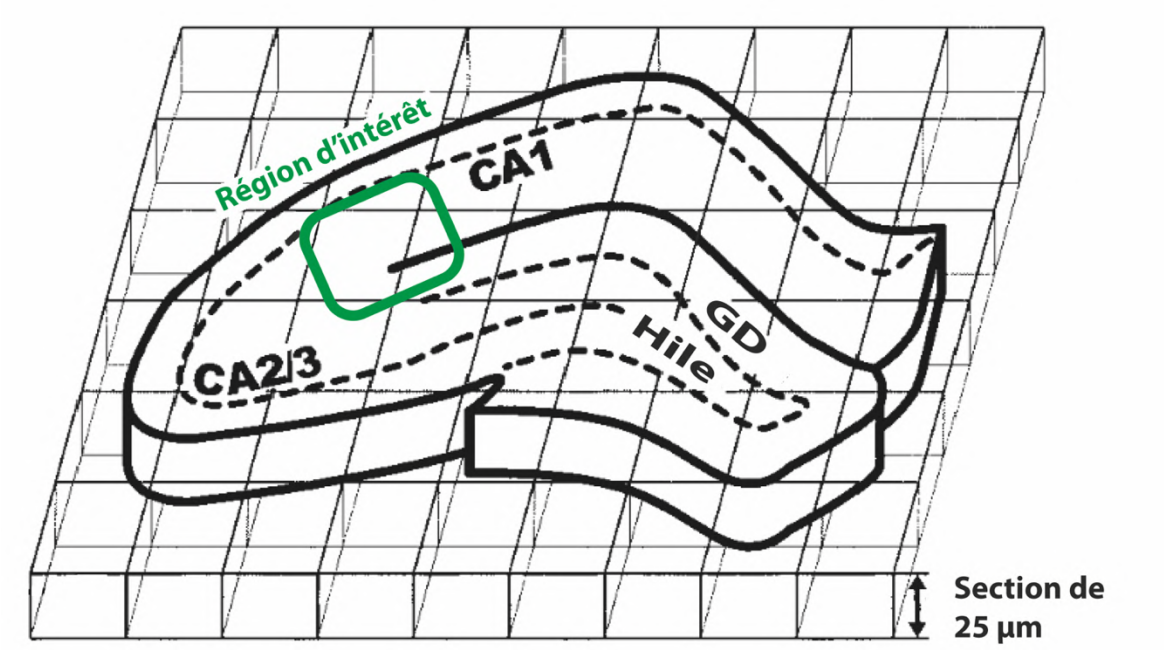


Figure 37 : Illustration schématique de la localisation de la région d'intérêt, dans l'hippocampe choisie pour le comptage des populations cellulaires sur une section de cerveau.

La région d'intérêt se situe entre le gyrus denté et la région CA1, au niveau de la couche médullaire du gyrus denté. Adapté de Grady, 2003.

des populations cellulaires d'astrocytes (GFAP) et de microglie (IBA1) sont réalisées manuellement sur le logiciel FIJI à partir d'acquisition réalisées grâce à un microscope à fluorescence Olympus BX41 (objectif 40X). Les populations cellulaires sont comptées dans la couche médullaire du GD, entre le GD et le CA1 sur 3 sections de cerveaux par individu (Figure 37). Pour chaque section, le nombre de cellules est ensuite ramené au nombre total de cellules par mm^3. Les marquages immunohistochimiques sont réalisés selon le même protocole que précédemment décrits à la différence du marquage secondaire. L'anticorps polyclonal anti-Doublecortine (DCX) de lapin dilué au 1/2000 (Synaptic System,326 003) est incubé pendant 2 j à 4°C. Après les lavages, l'anticorps secondaire, un anti-lapin biotinylé, prêt à l'emploi (Vectorlabs, BP-9100) pendant 2 heures à température ambiante. Après lavages, l'avidin-HRP est ajoutée grâce au kit *Vectasatin Elite* ABC (Vector labs, PK-6100) selon les directions du kit. Enfin la réaction du secondaire est révélée par chemiluminescence en utilisant le kit DAB (Vectorlabs, SK-4100). Le nombre de cellules positives pour la doublecortine par coupe de GD, au niveau de la couche subgranulaire, a été évaluée par comptages manuels au microscope Olympus BX41 (objectif 40X), à partir de 3 coupes par individu.

Les figures d'illustration des marquages de populations cellulaires sont issues d'acquisitions en z réalisées sur un microscope confocal SP8 (Leica Microsystems) à l'objectif 60X et traitées par projection maximale sur le logiciel FIJI.

1.3. *Expériences in vitro*

Culture primaire de neurones

Les neurones primaires d'hippocampe ont été préparés à partir de souriceaux C57BL6/J à jour postnatal 0-1. La préparation des neurones est identique à celle réalisée avec les neurones de rat pour la partie du projet sur le BoDV. Brièvement, après récupération des hippocampes, les tissus sont digérés par de la papaïne puis dissociés dans du LO-OVO 1X. Les cellules dissociées sont ensuite filtrées et déposées sur un coussin de BSA 4% pour éliminer les cellules gliales. Quelques changements sont cependant apportés au protocole : le milieu Neurobasal-A (Gibco) est utilisé comme base au milieu de culture. Par ailleurs, les neurones sont ensemencés dans des puits coatés à la poly-D-lysine (Merck-Millipore) ou sur des lamelles précoatées poly-D-lysine et laminine (Corning) réhydratées le jour de la dissection. Les neurones sont cultivés pendant 14 jours dans un incubateur (37 °C, CO_2 5%) avant d'être traités.

Traitement

A 14 jours de culture *in vitro*, les neurones sont traités avec des doses croissantes (voir figures dans les résultats) de cytokines pro-inflammatoires recombinantes murines suivantes : IL-1β ou IL-6 ou TNFα reconstituées dans une solution saline (NaCl) 0,9 %-BSA 0,1 %. Les traitements sont mis directement dans le milieu pendant 5 h à l'incubateur (37 °C, CO_2 5%). Après les 5 h de traitement, les cultures sont rincées avec du PBS 1X à 37 °C puis les protéines sont extraites, selon les mêmes procédures détaillées dans la première partie des résultats de mon projet de thèse.

Western blot

La procédure de WB est la même que pour les expériences de la première partie de résultats. Brièvement, les protéines sont extraites avec un tampon RIPA (complété avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases), soniquées puis centrifugées pour récupérer le surnageant. Les échantillons sont déposés sur un gel polyacrilamide Bis-Tris 4-15 % (BioRad) et séparé par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium) et transférés sur une membrane de nitrocellulose 0,22 μm. Les membranes sont bloquées avec du tampon Intercept Odyssey (Li-COR) et incubées 3 h à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C en présence des anticorps primaires suivants : polyclonal anti-γH2A.X de souris dilué au 1/1000 (ThermoFisher, MA1-2022) et le monoclonal anti-β-Actin de souris dilué au 1/50000 (Sigma, A5441). Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorophore infrarouge CF770 (Biotium) dilué au 1/10000 dans du tampon Intercept Odyssey pendant 45 min à température ambiante. Les signaux sont analysés et quantifiés en utilisant un imageur à infrarouge Odyssey Li-COR Fc couplé avec le logiciel Image studio (Li-COR).

Analyse en aveugle et tests statistiques

Les analyses et chronométrages manuels des vidéos de comportement, ainsi que les comptages des populations gliales et des foyers de 53BP1 ont été réalisés à l'aveugle sans que ni le génotype, ni le traitement de l'individu ne soient connus. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism 8 (GraphPad). La distribution normale des données a été vérifiée avec le test de normalité de D'Agostino et Pearson, et le test de Bartlett a été utilisé pour vérifier l'égalité des variances. Une correction de Welch a été appliquée lorsque les

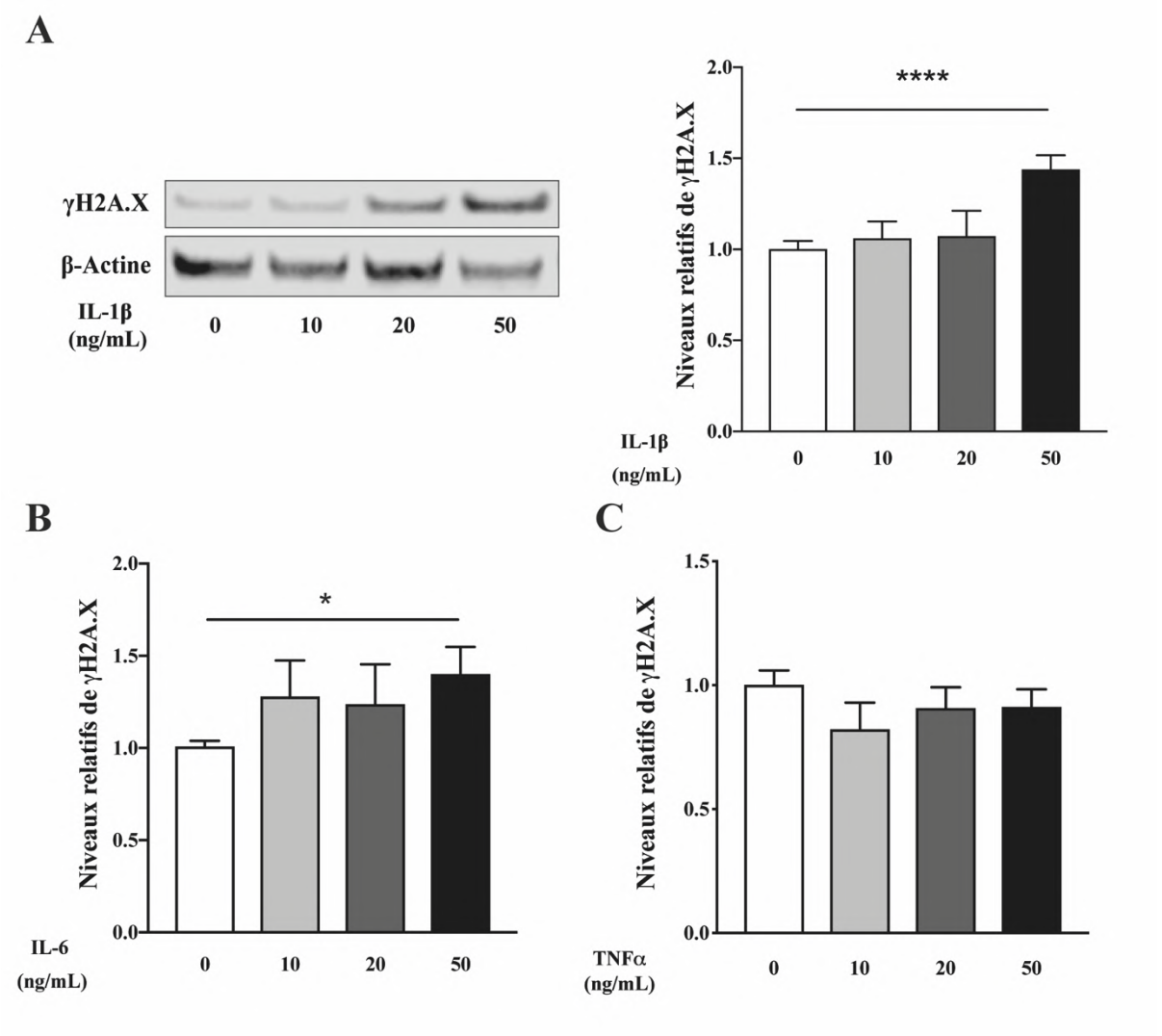


Figure 38 : L'IL-1β et l'IL-6 augmentent les niveaux de cassures double-brin dans des neurones primaires d'hippocampe de souris.

Après 14 j de cultures, des neurones primaires ont été traitées par de l'IL-1β (A) ou l'IL-6 (B) ou le TNFα (C) aux doses de 10, 20 et 50 ng/mL pendant 5 h et les niveaux de γH2A.X sont quantifiés par Western blot. **(A)** A gauche, un Western blot représentatif des niveaux de γH2A.X et de la β-actine dans les cultures primaires de neurones traitées avec l'IL-1β. A droite, les quantifications des signaux. n = 2 à 3 puits par conditions sur 3 à 9 expériences indépendantes. **(B)** Quantification des signaux pour des cultures traitées avec l'IL-6. n = 1 à 3 puits par conditions sur 2 à 5 expériences indépendantes **(C)** Quantification des signaux pour des cultures traitées avec le TNFα. n = 2 à 3 puits par conditions sur 3 à 4 expériences.
Les signaux γH2A.X sont normalisés sur ceux de la β-actine. La moyenne des ratios γH2A.X sur β-actine dans les cultures traitées avec 0 ng/ml d'IL-1β a été définie à 1 pour chaque expérience. ****p<0,0001, *p<0,05 *vs.* IL-1b = 0 ng/mL par le *post-hoc t-test* de Dunnett avec une correction de Welch. Les barres représentent la moyenne ± SEM (erreur type)

variances n'étaient pas égales. Chaque test utilisé est spécifié dans la légende de chaque figure. L'hypothèse nulle est rejetée pour $p<0,05$.

2. RESULTATS

2.1. *L'IL-1β et l'IL-6 augmentent les niveaux de cassures double-brin dans des de neurones primaires d'hippocampe de souris*

La neuroinflammation est caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires donc les principales sont l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα. C'est pourquoi nous avons décidé de tester l'impact ces trois cytokines sur les niveaux de CDB dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe de souris à la naissance. Les cultures primaires ont été traitées avec des doses croissantes de cytokines et aux doses de 50 ng/mL, les neurones traités par l'IL-1β ou l'IL-6 présentent une augmentation significative des niveaux de γH2.AX. Pour l'IL-1β, à la dose de 50 ng/mL, l'augmentation est d'environ 43,9 % ± 7,7 % (erreur type) (Figure 38A) et pour IL-6, à la même dose, l'augmentation est de 34,1 % ± 14,6 % (erreur type) (Figure 38B). Mais le TNFα n'induit pas de modifications des niveaux de CDB dans les neurones aux doses utilisées (Figure 38C). La dose supérieure de 100 ng/mL a également été testée pour toutes les cytokines mais apparait comme étant cytotoxique dans les conditions de l'expérience (données non montrées).

Ces résultats ont mis en évidence que l'IL-1β et l'IL-6 peuvent induire une augmentation des CDB dans l'ADN des neurones primaires d'hippocampe. Ainsi, à la vue des résultats obtenus *in vitro* et des données de la littérature sur l'omniprésence de l'IL-1β dans la neuroinflammation, nous avons choisi d'utiliser cette cytokine pour les traitements chroniques *in vivo* et les analyses de comportement.

2.2. *L'infusion chronique par de l'IL-1β systémique conduit à des défauts de mémoire et à l'accumulation de cassures double-brin dans l'hippocampe de souris sauvages*

Des mini-pompes osmotiques implantées en sous-cutanée ont été utilisées pour traiter des souris chroniquement par de l'IL-1β (souris IL-1β) de pendant 28 jours. Un groupe de souris implantées avec des mini-pompes infusant de la saline 0,9 % + BSA 0,1 % (souris saline) a été utilisé comme groupe contrôle.

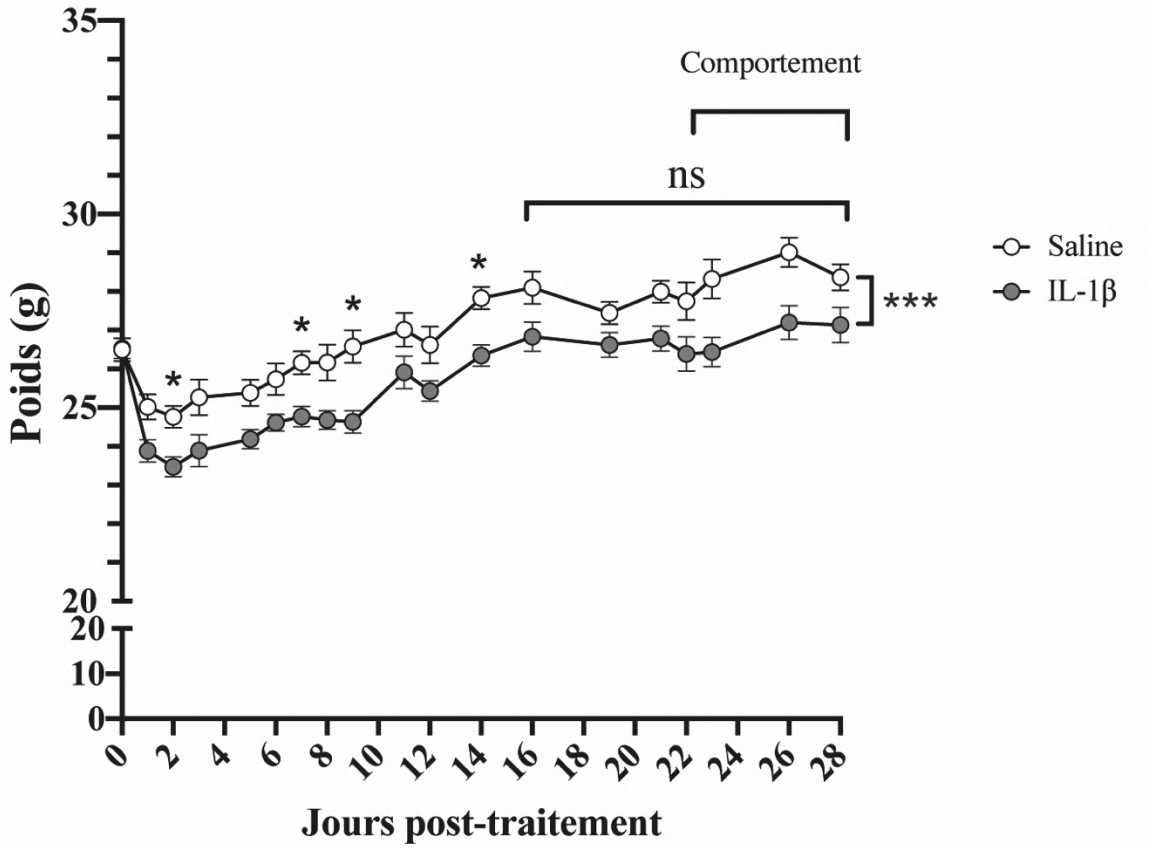


Figure 39 : Courbe de l'évolution des poids des souris C57BL6/J au cours de l'infusion systémique d'IL-1 β.

Les souris ont été implantées en sous-cutanées par des mini-pompes osmotiques pour un traitement chronique par de l'IL-1β à une dose de 5 µg/kg/j ou par son véhicule (saline). Le poids des souris a été suivi jusqu'au sacrifice. n = 21 souris saline et n = 21 souris IL-1β dans deux cohortes indépendantes. L'analyse statistique par modèles mixtes (REML) montre un effet significatif de l'interaction du traitement avec le temps (***p<0,001). ns : non significatif, *p<0,05 par *post-hoc* tests de Bonferroni entre les conditions IL-1β et saline au même jour. Les barres représentent la moyenne ± SEM

Le poids des souris a d'abord été suivi régulièrement. Dans les premiers jours, nous avons observé une perte de poids associée à la récupération post-chirurgicale mais cette diminution était plus importante chez les souris IL-1β avec une différence significative à J2 (Figure 39). A J4-J5, toutes les souris recommencent à reprendre du poids et malgré quelques différences dans la vitesse de prise de poids, les souris IL-1β et les souris saline finissent par récupérer et avoir des poids non significativement différents au moment des tests de comportement (J24).

Ces résultats suggèrent donc que l'infusion de la cytokine à bien lieu car les souris IL-1β subissent des pertes de poids initiales plus importantes que les souris saline, un symptôme caractéristique du SBS observé dans les premiers jours d'infusion. Par la suite les poids ne sont plus différents et permettent d'évaluer le comportement des souris.

Le traitement chronique par de l'IL-1β ne semble pas induire d'anxiété ou de troubles moteurs chez la souris sauvage

Le premier test réalisé à 24 j de traitement est le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM) qui permet d'évaluer le niveau d'activité et d'anxiété des souris. Les déplacements des souris dans les différents bras sont enregistrés puis analysés par l'intermédiaire d'un logiciel de traçage qui permet d'obtenir des représentations graphiques des *heat map* de zones d'occupation et des déplacements (Figure 40A). L'analyse des distances totales parcourues par les souris montrent que ces distances sont équivalentes entre les souris IL-1β et saline montrant que le traitement à l'IL-1β n'altère pas la motricité des souris (Figure 40B). Également, les pourcentages d'entrée et de temps passé dans le bras ouvert ne montrent pas de différences significatives entre les deux conditions (Figure 40C-D). Cependant, les résultats obtenus sur le temps passé dans le bras ouvert suggèrent que les souris IL-1β présentent un comportement légèrement désinhibé ou moins anxieux qui ne les freinent pas dans l'exploration du bras ouvert.

Les résultats obtenus sur une seule cohorte nécessitent d'être reproduits afin de de confirmer ou d'infirmer la légère désinhibition observée des souris IL-1β.

Le traitement chronique par de l'IL-1β conduit à des troubles de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante

Après avoir analysé le comportement inné des souris, nous avons voulu évaluer leurs capacités d'apprentissage et de mémorisation. D'abord, nous avons vérifié si les souris étaient capables d'explorer l'arène de ces tests de manière équivalente et d'exclure des biais éventuels de préférence latérale qui seraient lié au dispositif, et qui pourraient biaiser les résultats obtenus avec ces tests. Les déplacements des souris enregistrés durant la phase d'habituation du NPR

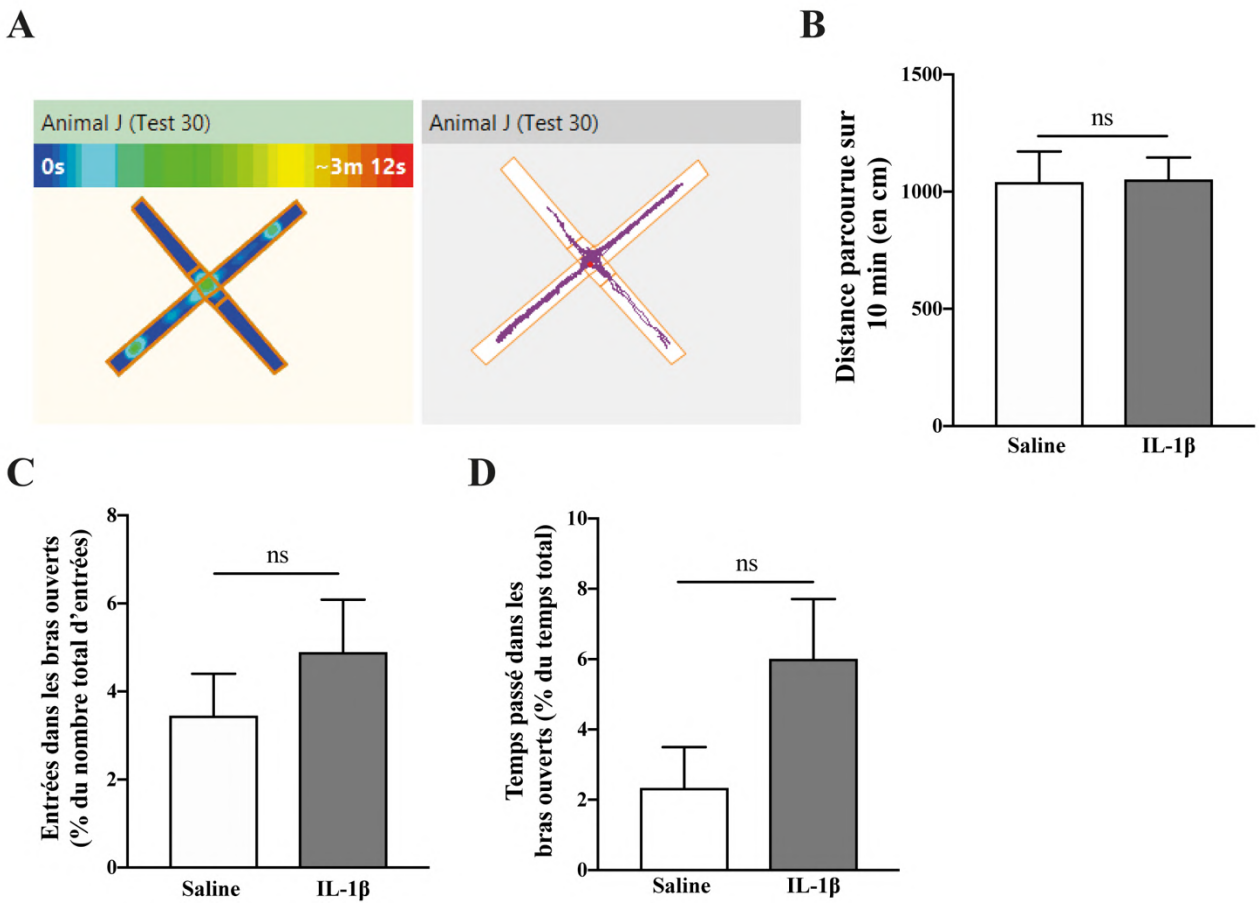


Figure 40 : Le traitement chronique par de l'IL-1β ne semble pas induire d'anxiété ou de troubles moteurs chez la souris sauvage

(A) Exemple représentatif de carte de chaleur (à gauche) et du tracés (à droite) des déplacements des souris par traçage avec le logiciel ANY-maze. **(B)** Mesures de la distance totale parcourue pendant les 10 min d'exploration **(C)** Quantifications des entrées dans les bras ouverts qui sont exprimées en pourcentage du nombre total d'entrées dans tous les bras. **(D)** Mesures du temps passé dans les bras ouverts qui sont exprimées en pourcentage du temps total d'exploration. n = 9 souris saline et n = 9 souris IL-1β sur une cohorte. ns : non significatif *vs.* saline, par test t de Student non apparié. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

ont été tracés. Les résultats montrent que, peu importe le traitement, les souris n'ont pas de préférence pour l'un ou l'autre côté de l'arène en phase initiale d'exploration puisqu'elles ne passent pas plus de temps à gauche qu'à droite (Figure 41A). Ainsi, les souris n'ont pas de biais de latéralité. De la même façon, les souris IL-1β parcourent la même distance que les souris saline durant les 10 min d'exploration (Figure 41B).

Nos analyses du NPR montrent que, durant la phase de test, les souris IL-1β passent plus de temps à explorer l'objet déplacé (N) puisque le pourcentage de temps passé à explorer cet objet est significativement supérieur au seuil de non préférence fixé à 50 % (Figure 41C). Les souris se souviennent donc de l'objet non déplacé (A). En revanche, les souris IL-1β n'ont pas de préférence entre l'objet A et N et passent autant de temps à explorer les deux objets (Figure 41C). Ces résultats indiquent que les souris IL-1β ne se souviennent plus de la position des objets explorés lors de la phase d'exploration initiale.

Nos analyses du NOR ont révélé que, durant la phase de test, dans le cas des souris traitées et non traitées, celles-ci passaient plus de temps avec l'objet remplacé/nouveau (N) avec un pourcentage du temps d'exploration de l'objet N significativement supérieur au seuil de non préférence (Figure 41D). Ainsi, les souris ont reconnu le changement d'objet 24 h après la phase d'habituation.

Ainsi, les souris traitées IL-1β ne présentent pas de troubles de la mémoire de reconnaissance d'objet, indépendante de l'hippocampe, impliquée dans le NOR. Cependant, les souris IL-1β ont des troubles de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe, impliquée dans le NPR.

La numération des populations gliales ne semble pas modifiée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β

La neuroinflammation est souvent accompagnée d'un recrutement et d'une prolifération des cellules gliales. Dans les cas extrêmes, la prolifération de ces cellules conduit à un environnement délétère pour les neurones et déclenche leur mort. Nous avons donc voulu ensuite étudier le nombre de cellules microgliales et d'astrocytes au niveau de l'hippocampe dans les souris IL-1β et saline. Le comptage a été réalisé entre le GD et le CA1 comme décrit dans le « Matériel et Méthodes ». Les marquages obtenus pour la GFAP nous permettent de quantifier dans cette région les astrocytes, tandis que ceux pour IBA-1 nous permettent de quantifier les cellules microgliales (Figure 42A). Les quantifications obtenues montrent qu'il n'y a pas de différences significatives dans le nombre d'astrocytes (Figure 42B) ou de cellules microgliales (Figure 42C) entre les hippocampes de souris IL-1β et de souris saline.

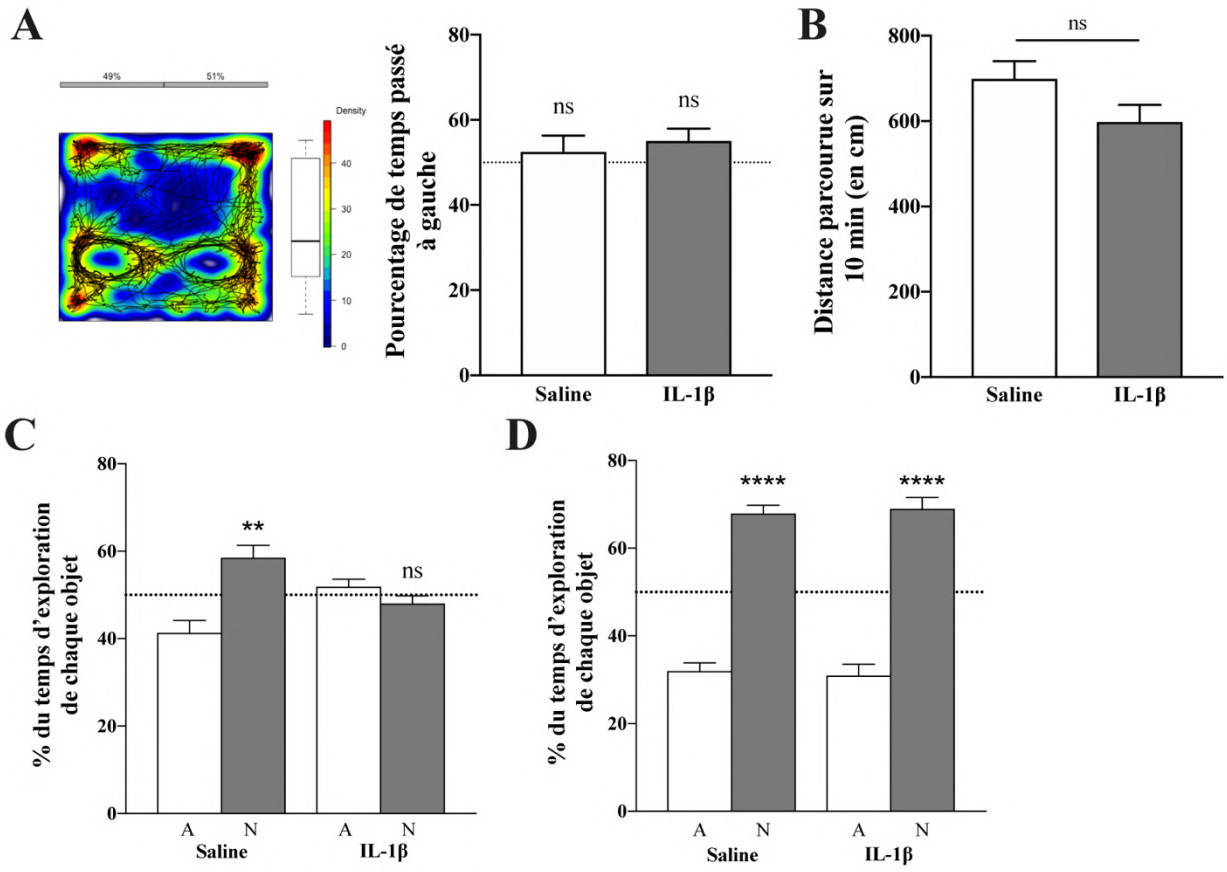


Figure 41 : Le traitement chronique par de l'IL-1β conduit à des troubles de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante

(A) Exemple représentatif de la *heat map* (à gauche) des déplacements d'une souris dans l'arène du NPR. A droite, les temps passés de chaque côté de l'arène ont été mesurés pour évaluer un éventuel biais de latéralité. L'histogramme à droite représente le pourcentage de temps passé à gauche de l'arène par rapport au seuil de non préférence de 50 % (ligne pointillée). n = 9 souris saline et n = 9 souris IL-1b sur une cohorte **(B)** Mesures de la distance totale parcourue pendant les 10 min d'exploration. n = 9 souris saline et n = 9 souris IL-1b sur une cohorte **(C)** Pourcentage de temps passé avec l'objet non déplacé (A) et l'objet déplacé (N) par rapport au temps total d'exploration d'objet pendant la phase de test du NPR. Le seuil de non préférence est fixé à 50 % (ligne pointillée). n = 14 souris saline et n = 11 souris IL-1b de deux cohortes indépendantes. **(D)** Pourcentage de temps passé avec l'objet ancien (A) et l'objet nouveau (N) par rapport au temps total d'exploration pendant la phase de test du NOR. Le seuil de non préférence est fixé à 50 % (ligne pointillée). n = 14 souris saline et n = 11 souris IL-1β de deux cohortes indépendantes. ns : non significatif, ****p<0,0001, **p<0,01 *vs.* 50 % par le t-test pour un échantillon de Wilcoxon pour l'objet N pour **(A), (C)** et **(D)**, ou IL-1β *vs.* saline par le t-test de Student non-apparié **(B)**. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

Ainsi, le traitement chronique par IL-1β ne semble pas induire d'astrogliose ou de microgliose apparente dans l'hippocampe. Ainsi, la quantité infusée de cytokine ne semble pas suffisante pour induire une neuroinflammation massive. Ces résultats seront complétés par d'autres cohortes pour validation.

La neurogenèse ne semble pas altérée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β

Il a été montré dans un modèle d'induction de la dépression médié par un traitement chronique à l'IL-1β, que cette dernière induisait des troubles dans la neurogenèse (Goshen *et al.*, 2008). Nous nous sommes donc demandés ce qu'il en était pour notre modèle. Nous avons réalisé un comptage des neurones immatures qui sont positives au marquage DCX dans la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Figure 43A-B). Les comptages réalisés montrent une absence de différence significative du nombre de neurones immatures entre les souris IL-1β et saline (Figure 43C). Cependant, il est observé une tendance à une diminution des neurones immatures chez les souris traitées à l'IL-1β.

Ainsi, ces résultats semblent suggérer qu'il n'existe pas de différences importantes, dans notre modèle, entre les quantités de neurones immatures entre les souris traitées chroniquement à l'IL-1β et saline.

Ces résultats montrent donc qu'un traitement chronique par de l'IL-1β conduit à des troubles de la mémoire hippocampo-dépendante mais que ces perturbations ne sont associées, ni par des modifications de population gliale, ni par un effet majeur sur la neurogenèse. C'est donc directement au niveau des fonctions neuronales que l'IL-1β semblent avoir un impact. En considérant nos résultats obtenus *in* vitro et pour commencer à élucider ces mécanismes, nous avons fait l'hypothèse que l'IL-1β pouvait perturber les CDB dans les neurones des souris.

Le traitement chronique par de l'IL-1β induit une augmentation du nombre de neurones avec des cassures double-brin, dans l'hippocampe

Pour quantifier les neurones qui présentent des CDB dans l'ADN des neurones de l'hippocampe nous avons marqué les coupes de tissu avec un anticorps dirigé contre 53BP1. Nous retrouvons le marquage diffus de 53BP1 caractéristique dans les noyaux des neurones des couches granulaires du GD et de la CA (Figure 44A). Les neurones positifs pour au moins un foyer de 53BP1 ont été dénombrés (Figure 44B). Nous avons réalisé des comptages séparés pour les deux sous-ensembles de l'hippocampe que sont le GD et la CA. D'abord, dans les GD issus

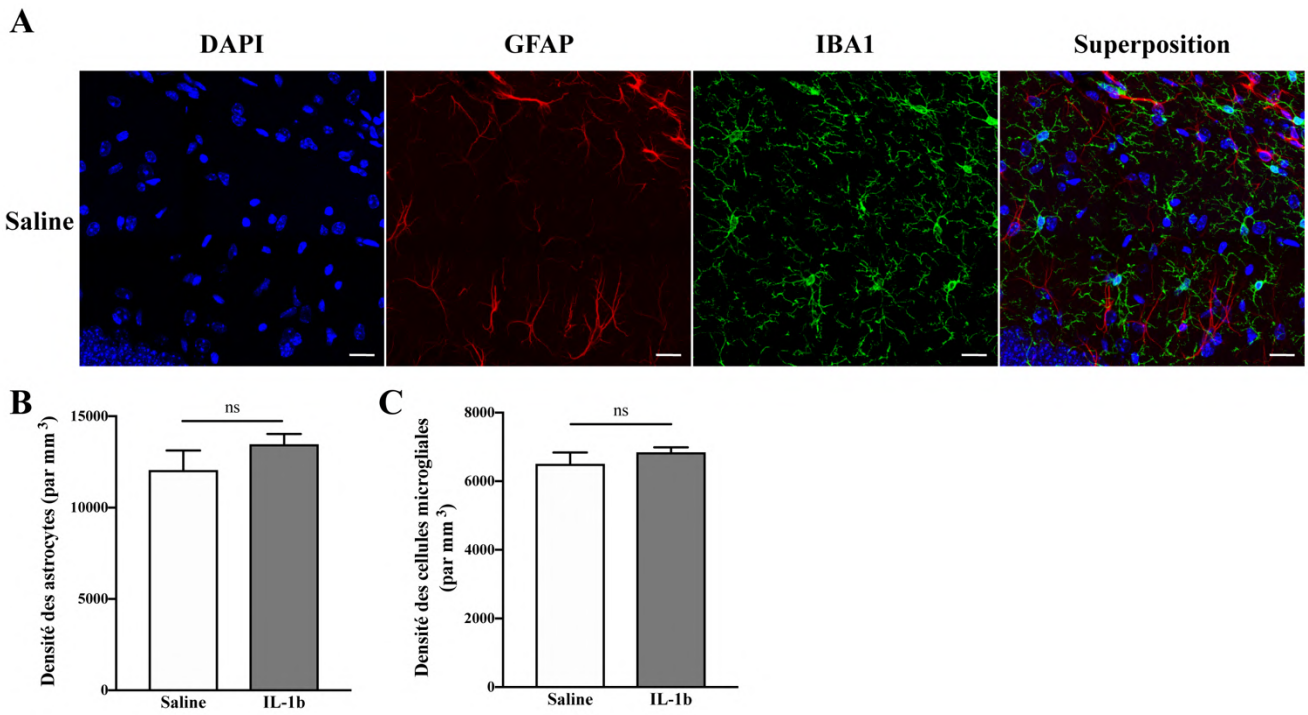


Figure 42 : La numération des populations gliales ne semble pas modifiée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β.
(A) Exemple représentatif d'un marquage immunohistofluorescent des populations de cellules gliales dans la région d'intérêt entre le GD et CA1 sur une coupe de cerveau de souris IL-1β. Le marquage GFAP (astrocytes) est en rouge, IBA-1 (microglie) est en vert et le marquage nucléaire avec le DAPI est en bleu. Section d'une mosaïque d'une coupe de cerveau prise au microscope confocal SP8 à l'objectif 63x. Barre d'échelle = 40 µm. **(B)** Quantification du nombre d'astrocytes par mm^3 de région d'intérêt. **(C)** Quantification du nombre de cellules microgliales par mm^3 de région d'intérêt. n = 2 à 4 sections par cerveau et par condition sur 5 souris saline et 5 souris IL-1β d'une cohorte. Les moyennes des densités de cellules pour la condition saline ont été définies à 1. ns : non significatif *vs.* saline par le t-test de Student non-appariée. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

de souris IL-1β, nous observons une augmentation significative du nombre de neurones positifs pour un foyer de CDB (5,4 *vs.* 9,2) (Figure 44C). De la même façon, dans le CA des souris IL-1β nous avons observé une augmentation significative du nombre de neurones positifs pour une CDB (6,00 *vs.* 9,3) (Figure 44D).

Ainsi ces résultats montrent que le traitement chronique à l'IL-1β augmente le nombre de neurones avec au moins une CDB dans l'hippocampe.

Afin d'étudier si les effets que nous avons observés d'un traitement chronique et systémique à l'IL-1β sur le comportement des souris, et les mécanismes cellulaires, nécessitaient la signalisation de l'IL-β directement au niveau du neurone, nous avons conduit les mêmes séries d'expériences avec des souris iIL-1R1 KO. Dans la partie suivante je vous présenterai les résultats préliminaires que nous avons obtenus. Toutes ces expériences doivent donc être reproduites pour confirmer ou infirmer les tendances que nous avons observées.

2.3. *La déficience du récepteur IL-1R1 prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β*

Les modèles originaux de souris que nous avons utilisés, nous permettent d'induire, à l'âge adulte, la délétion du gène codant l'IL-1R1 spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe. Ce modèle nous permet de nous affranchir des troubles du développement que pourrait causer un KO total et nous permet également d'étudier avec précision le rôle de la signalisation par l'IL-1β directement au niveau des neurones de l'hippocampe.

Le traitement chronique par de l'IL-1β ne semble pas induire d'anxiété ou de troubles moteurs chez les souris iIL-1R1 KO

D'abord, nous avons observé qu'il n'y avait pas d'effets du traitement sur la distance parcourue (Figure 45A) et sur le nombre d'entrées dans les bras ouverts. L'expression de l'IL-1R1 au niveau des neurones ne semble pas non plus avoir d'effet sur ces mesures (Figure 45B). En revanche, nous observons une tendance à une augmentation du temps passé dans le bras ouvert pour les souris iIL-1R1 KO saline qui reste non significative et disparait dans les souris KO traitées avec l'IL-1β (Figure 45C). Ainsi, ces résultats ne suggèrent pas un impact majeur de la délétion du gène ou du traitement (comme pour les souris sauvages) sur l'anxiété des souris et leur motricité.

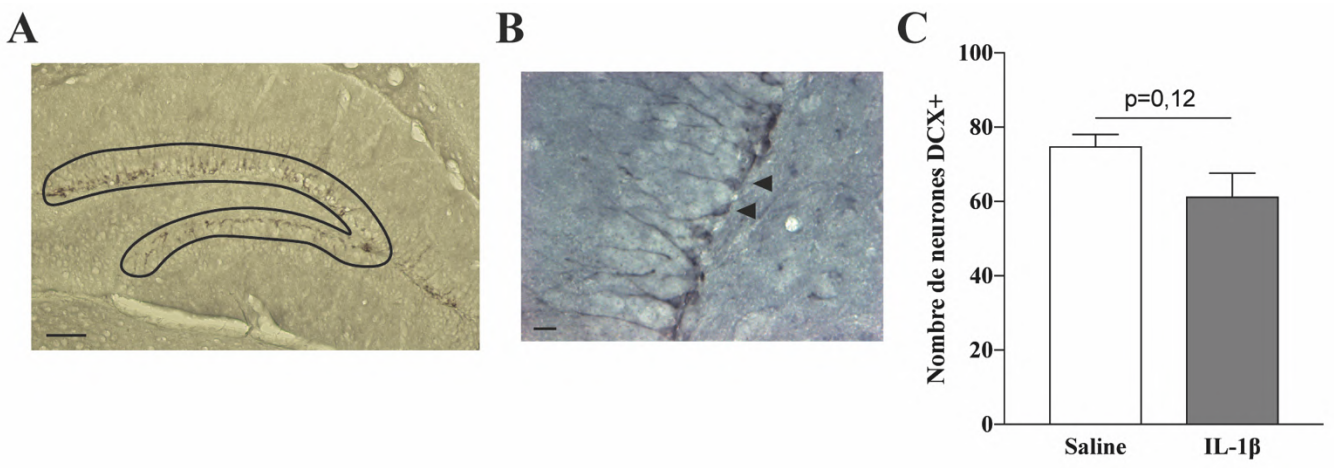


Figure 43 : La neurogenèse ne semble pas altérée dans l'hippocampe de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β.
(A) Exemple d'un marquage immunohistochimique des neurones immatures avec le marqueur DCX sur une section de cerveau de souris. Les comptages sont réalisés dans la couche subgranulaire du GD (aire tracée). Acquisition au microscope optique à l'objectif 10x. Barre d'échelle : 100 µm. **(B)** Exemple de neurones immatures positifs pour DCx (pointes de flèche). Acquisition au microscope optique à l'objectif 40x. Barre d'échelle : 20 µm. **(C)** Quantification du nombre de neurones positifs pour DCx dans l'aire tracée. n = 3 sections par souris pour une cohorte de 5 souris saline et 4 souris IL-1 . Test non significatif à p = 0,12 *vs.* saline avec le t-test de Student non apparié. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

L'altération des troubles de la mémoire induite par le traitement chronique par de l'IL-1β est évité en délétant le gène codant le récepteur IL-1R1

L'induction de la délétion du gène *Il-1r1* ne semble pas impacter la reconnaissance de l'objet déplacé (N) chez les souris saline. Par ailleurs, la même absence de reconnaissance de l'objet déplacé, observé auparavant chez les souris sauvages IL-1β, est retrouvé chez les souris IL-1β mais non déficientes en IL-1R1 (Figure 45D). De manière fascinante, les souris déficientes en IL-1R1 neuronal passent plus de 50 % du temps à explorer l'objet déplacé.

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que les souris déficientes en IL-1R1 au niveau de leurs neurones conservent leurs capacités de mémorisation spatiale hippocampo-dépendante malgré un traitement chronique par l'IL-1β.

La numération des populations gliales ne semble pas modifiée dans l'hippocampe de souris déficientes pour IL-1R1, traitées chroniquement par de l'IL-1β

Les souris iIL-1R1 KO traitées par de l'IL-1β ne semblent pas montrer de différences ni dans le nombre d'astrocytes (Figure 45E) et ni dans le nombre de cellules microgliales (Figure 45F) par rapport aux souris non déficientes en IL-1R1. Aussi, les souris traitées chroniquement à l'IL-1β, qu'elles soient déficientes ou non pour le récepteur ne présentent pas non plus de différences importantes dans le nombre d'astrocytes (Figure 45E) et le nombre de cellules microgliales (Figure 45F). Il semble cependant qu'il y ait une légère augmentation, non significative, pour cette cohorte, du nombre de cellules microgliales chez les souris traitées à l'IL-1β, mais non déficientes pour le récepteur.

Ces résultats montrent donc que la délétion du récepteur IL-1R1 ne semble pas avoir d'impact majeur sur les populations gliales, quel que soit le traitement reçu par les souris.

Dans les premières expériences nous avons trouvé que les niveaux de CDB été augmentées chez les souris traitées chroniquement par de l'IL-1β. Nous nous sommes donc demandés si cette augmentation des CDB était associée aux troubles de la mémoire observés après traitement par de l'IL-1β. A l'heure actuelle, il est impossible techniquement de bloquer la génération des CDB. Nous avons donc décidé de bloquer la signalisation précoce induite par la détection des CDB. Le modèle iH2A.X KO que nous étudions, nous permet ainsi de bloquer la détection et à la signalisation induite par la phosphorylation du variant d'histone H2A.X, spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe, à l'âge adulte.

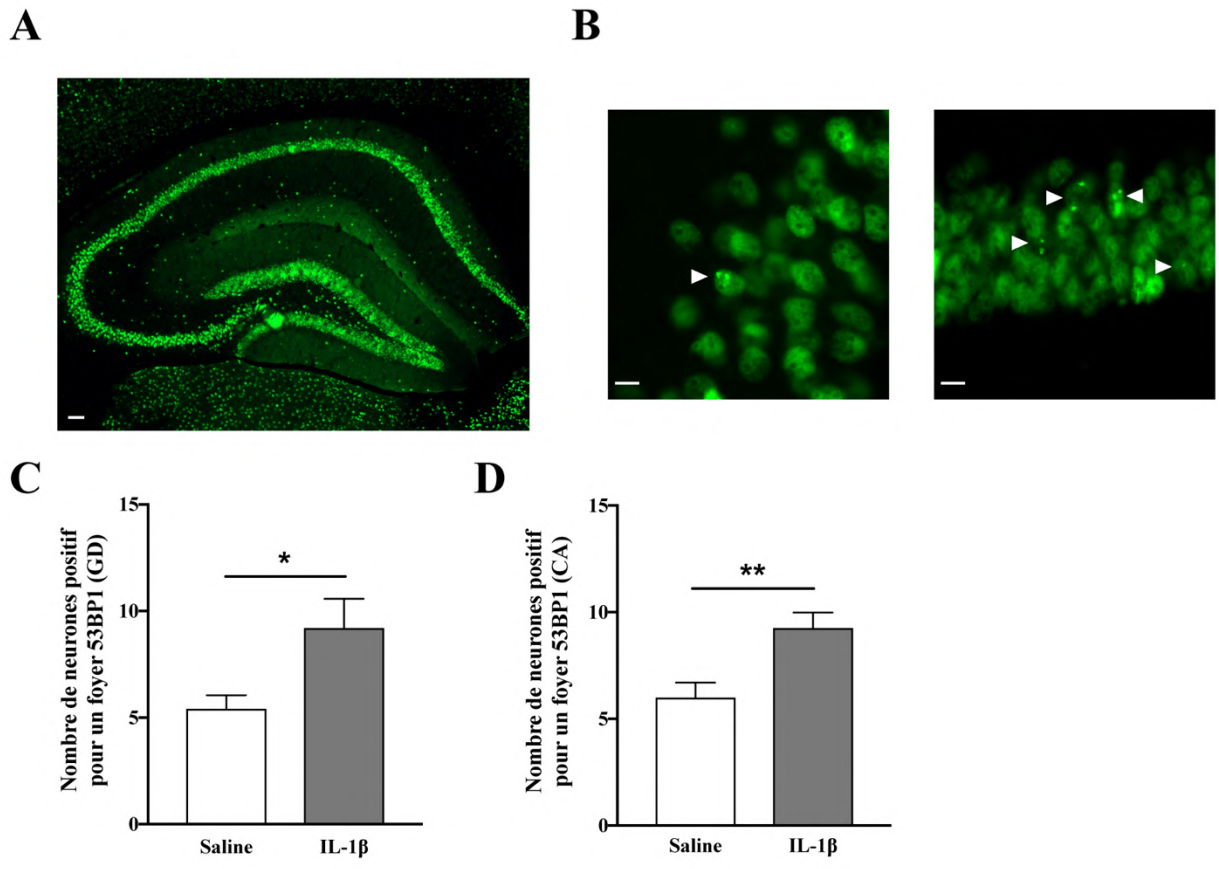


Figure 44 : Le traitement chronique par de l'IL-1β induit une augmentation du nombre de neurones avec des cassures double-brin, dans l'hippocampe.
(A) Exemple représentatif d'un marquage immunohistofluorescent de foyer de CDB avec un anticorps dirigé contre 53BP1 (vert) sur une coupe de cerveau, centrée sur la région de l'hippocampe. Les noyaux des neurones ont un marquage diffus 53BP1 au niveau des couches granulaires du GD et du CA. Acquisition de l'image au microscope à fluorescence Olympus à l'objectif 4x. Barre d'échelle = 100 µm. **(B)** Les marquage 53BP1 forme des foyers aux sites de CDB (pointes de flèche). Acquisition de l'image au microscope à fluorescence Olympus à l'objectif 40x. Barre d'échelle = 10 µm. **(C)** Quantification du nombre de neurones positifs pour au moins un foyer 53BP1 au niveau du GD. **(D)** Quantification du nombre de neurones positifs pour au moins un foyer 53BP1 au niveau du CA. n = 2 à 3 sections sur 11 souris saline et 11 souris IL-1β de deux cohortes indépendantes. **p<0,01, *p<0,05 *vs.* saline par le t-test de Student, avec une correction de Welch pour **(C)**. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

Dans la partie suivante je vous présenterai les résultats préliminaires que nous avons obtenus. Toutes ces expériences doivent donc être reproduites pour confirmer ou infirmer les tendances que nous avons observées.

2.4. *La déficience du variant d'histone H2A.X prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β*

L'altération des troubles de la mémoire induite par le traitement chronique par de l'IL-1β est évité en délétant le gène codant l'histone H2A.X.

Nous avons d'abord confirmé que la délétion du gène *H2a.x* avait bien été efficace que la protéine n'était plus retrouvée dans l'hippocampe des souris iH2A.X KO (Figure 46A). L'induction de la délétion du gène *H2a.x* ne semble pas affecter la reconnaissance de l'objet déplacé (N) chez les souris IL-1β (Figure 46B). De la même façon que pour les deux précédentes études en NPR, les souris IL-1β non déficientes en H2A.X passent autant de temps avec l'objet N qu'avec l'objet A et présentent donc des troubles de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante. Nous avons noté cependant, que les souris non déficientes saline n'avait pas une préférence significative pour l'objet déplacé due à un faible échantillon pour ce groupe (4 souris). De façon intéressante, les résultats obtenus semblent indiquer que les souris déficientes pour la protéine H2A.X, traitées par l'IL-1β ont tendance à explorer davantage l'objet N que l'objet A.

Ainsi ces résultats suggèrent que l'induction de la délétion du gène *H2a.x* permet de prévenir les troubles de la mémorisation spatiale hippocampo-dépendante malgré l'infusion chronique d'IL-1β. Ils indiquent ainsi que la détection des cassures par H2A.X pourrait être déterminante des effets de l'IL-1β chronique sur la mémoire.

La numération des populations gliales ne semble pas modifiée dans l'hippocampe de souris déficientes pour H2A.X, traitées chroniquement par de l'IL-1β

Comme précédemment, nous avons voulu vérifier les numérations des populations de cellules gliales. Les quantifications du nombre des différentes populations de cellules gliales suggèrent qu'il n'y a pas un effet général du traitement par l'IL-1β sur le nombre d'astrocytes (Figure 46C) ou sur le nombre de cellules microgliales (Figure 46D). De plus, la délétion de H2A.X ne semble pas avoir un impact sur le nombre d'astrocytes (Figure 46C) ou sur le nombre de cellules microgliales (Figure 44D). Cependant, nous avons noté une légère astrogliose, qui

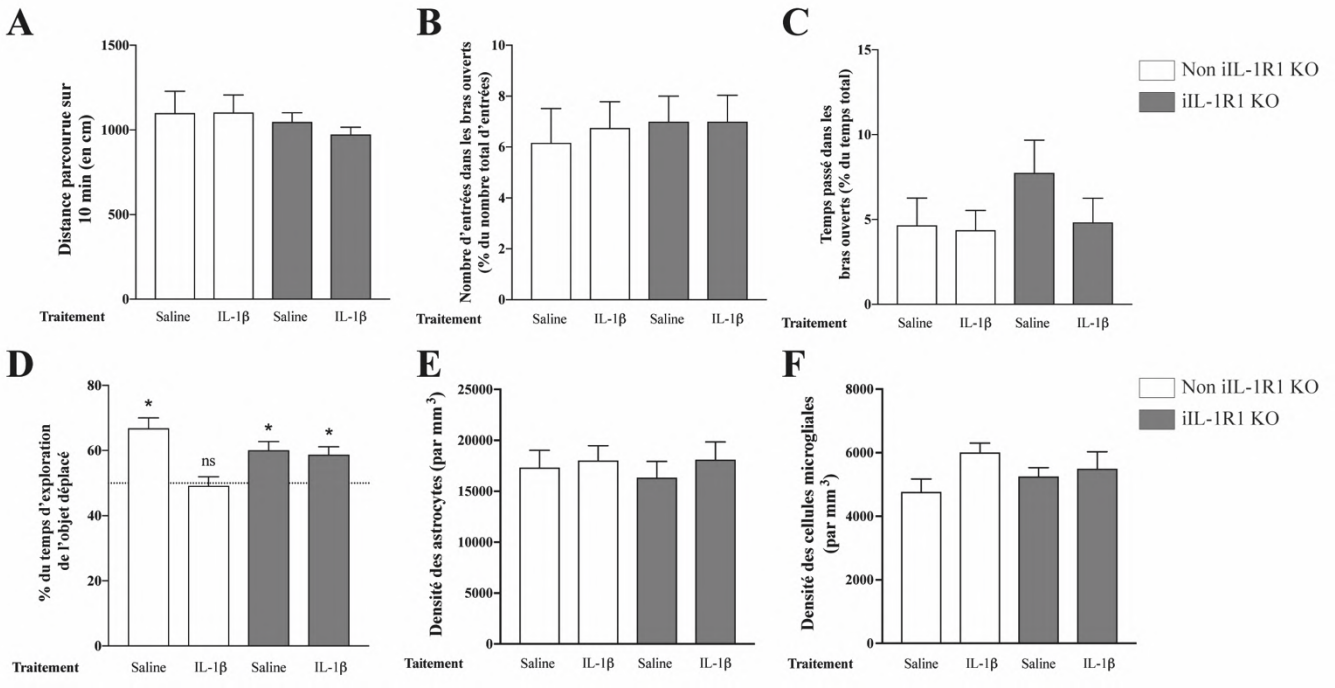


Figure 45 : La déficience du récepteur IL-1R1 prévient les troubles de la mémoire des souris traitées chroniquement à l'IL-1β.

Dans ces expériences, des souris dont le défaut en IL-1R1 a été induit ou non dans les neurones excitateurs, ont été traitées chroniquement par l'IL-1β à une dose de 5 µg/kg/j ou par son véhicule (saline). **(A)** Mesures de la distance totale parcourue pendant les 10 min d'exploration durant le test de l'EPM **(B)** Quantifications des entrées dans les bras ouverts qui sont exprimées en pourcentage du nombre total d'entrées dans tous les bras dans l'EPM. **(C)** Mesures du temps passé dans les bras ouverts qui sont exprimées en pourcentage du temps total d'exploration dans l'EPM. **(D)** Pourcentage de temps passé avec l'objet déplacé (N) par rapport au temps total d'exploration pendant la phase de test du NPR. Le seuil de non préférence est fixé à 50 % (ligne pointillée). **(E)** Quantification du nombre d'astrocytes par mm^3 de région d'intérêt. **(F)** Quantification du nombre de cellules microgliales par mm^3 de région d'intérêt. **(A), (B)** et **(C)** n = 5 à 8 animaux par condition sur une cohorte. Pas de différences ou d'interactions observées en *Two-way* ANOVA. **(D)** n = 5 à 8 animaux par condition sur une cohorte. ns : non significatif, *p<0,05, *vs.* 50 % par le t-test pour un échantillon de Wilcoxon. **(E)** et **(F)** n = 2 à 3 sections par souris pour 5 à 8 souris par condition sur une cohorte. Pas de différences ou d'interactions observées en *Two-way* ANOVA. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

apparait significative avec le test statistique pour les souris non déficientes traitées par de l'IL-1β, par rapport aux souris saline (Figure 46C).

Malgré une légère astrogliose ches les souris non déficientes traitées par de l'IL-1β, que nous discuterons plus tard, ces résultats suggèrent donc que la délétion de H2A.X ne semble pas avoir d'impact majeur sur le nombre d'astrocytes, que les souris soient traitées ou non.

En conclusion, nos premiers résultats *in vivo,* indiquent que la circulation chronique systémique d'IL-1β, entraine l'augmentation des niveaux de CDB dans les neurones de l'hippocampe qui s'accompagne de troubles de la mémoire spatiale. D'après nos expériences préliminaires, ces troubles semblent dépendre directement de la signalisation en aval du récepteur à d'IL-1β et implique la signalisation précoce suite à la détection des CDB, spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe.

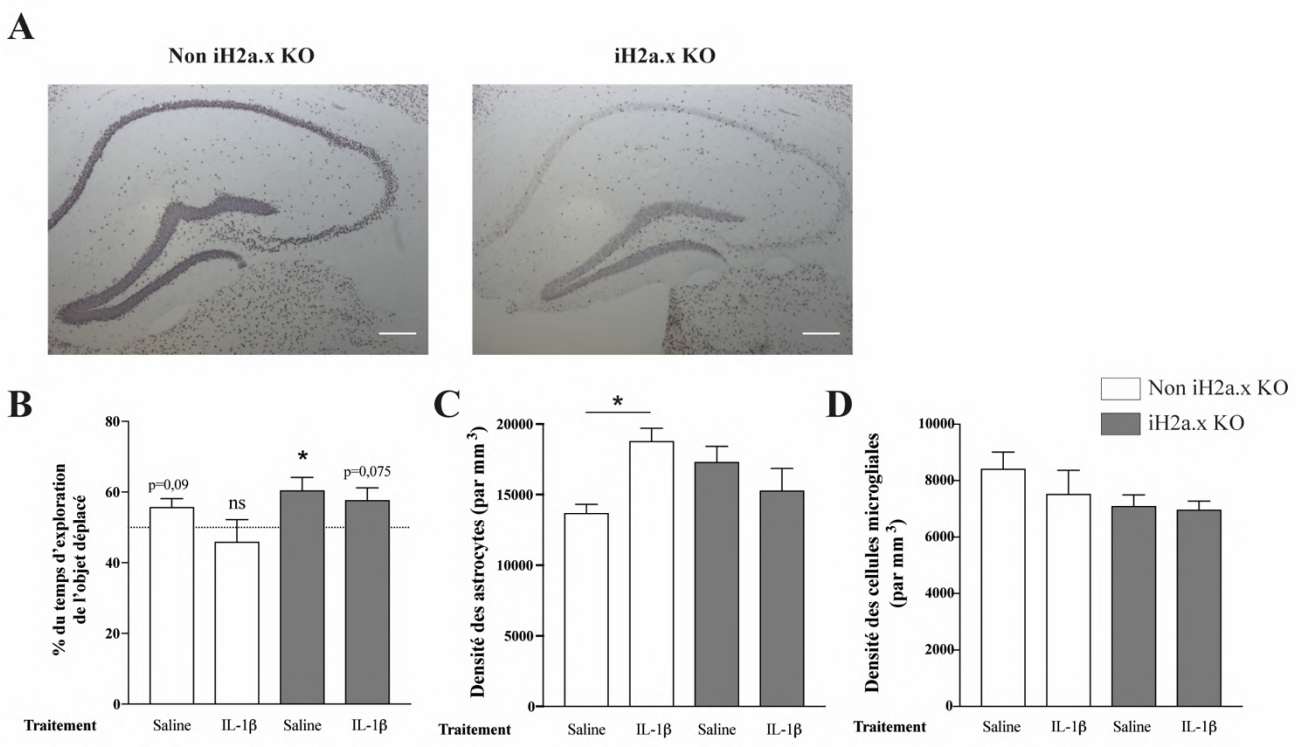


Figure 46 : Test comportemental et analyse des populations des cellules gliales pour les expériences avec les souris iH2A.X KO.

Dans ces expériences des souris dont le défaut en H2A.X a été induit ou non, ont été traitées chroniquement avec l'IL-1β à une dose de 5 µg/kg/j, ou par son véhicule (saline).

(A) Contrôle de l'expression de l'histone H2A.X dans des souris dont la délétion pour le gène *H2a.x* a été induite ou non, par marquage DAB. Acquisition au microscope optique à l'objectif 10x microscope optique. Barre d'échelle : 500 µm. **(B)** Pourcentage de temps passé avec l'objet l'objet déplacé (N) par rapport au temps total d'exploration pendant la phase de test du NPR. Le seuil de non préférence est fixé à 50 % (ligne pointillée). **(C)** Quantification du nombre d'astrocytes par mm^3 de région d'intérêt. **(D)** Quantification du nombre de cellules microgliales par mm^3 de région d'intérêt. **(B)** n = 5 à 6 animaux par conditions sur une cohorte. ns : non significatif, *p<0,05, *vs.* 50 % par le t-test pour un échantillon de Wilcoxon. **(C)** et **(D)** n = 3 sections par souris pour 4 à 6 souris par condition sur une cohorte. *p<0,05, une différence par le *post-hoc t-test* de Dunnett après une interaction significative en *Two-way* ANOVA **(C)**. Les barres représentent la moyenne ± SEM.

Discussion et perspectives

I. CONCLUSION GENERALE

Au cours de mon travail de thèse, nous souhaitions étudier l'impact de deux conditions pathologiques indépendantes sur l'équilibre CDB/réparation, un nouveau mécanisme épigénétique important pour les fonctions neuronales. L'objectif était aussi de mettre en relation d'éventuelles perturbations de cet équilibre avec les dysfonctionnements neuronaux et/ou les troubles de l'apprentissage et de la mémorisation observés dans ces conditions pathologiques. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur une condition d'infection virale par le BoDV par le BoDV, caractérisée par une persistance dans les neurones et une absence de réaction inflammatoire ou de mort neuronale. Puis, indépendamment d'une infection virale, nous avons étudié la neuroinflammation et en particulier le rôle d'une cytokine pro-inflammatoire majeure produite durant ce phénomène : l'IL-1β.

D'abord, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que l'infection des neurones par le BoDV conduit à une augmentation des niveaux de CDB dans les neurones, à cause de ses protéines N et P. Nous avons aussi montré que les CDB dans les neurones infectés étaient majoritairement colocalisées avec des usines virales de réplication, les vSPOT. La production de CDB par traitements pharmacologiques conduit à une augmentation du nombre de vSPOT dans les neurones infectés et s'accompagne d'une augmentation de la réplication du virus. Ensuite, nous avons montré que le BoDV peut bloquer l'induction de CDB qui, en conditions physiologiques sont induites, par la stimulation. Nous avons alors découvert que le BoDV bloque l'expression à la surface des neurones des NMDAR dont la stimulation est à l'origine de l'augmentation transitoire des CDB physiologiques. Enfin, nous avons démontré que les neurones infectés présentent une activité spontanée réduite par rapport à des neurones non infectés.

Ensuite, mes travaux ont révélé le rôle majeur de l'IL-1β dans les troubles de la mémoire spatiale associés à la neuroinflammation chronique. Cette perturbation n'est pas associée aux autres manifestations de la neuroinflammation que sont une microgliose ou une astrocytose, ou la perturbation de la neurogenèse. Nous avons alors découvert que l'IL-1β peut augmenter les niveaux de CDB, *in vitro*, en culture primaire de neurones, mais également *in vivo*, au niveau des neurones de l'hippocampe de souris chroniquement traitées de manière systémique par la

cytokine. En outre, nos résultats préliminaires suggèrent que la perturbation de la mémoire observée après traitement chronique par de l'IL-1β est directement associée à la signalisation dépendante de l'IL-1R1 et de la détection des CDB impliquant H2A.X, spécifiquement au niveau des neurones excitateurs de l'hippocampe. Ainsi, une neuroinflammation chronique de faible intensité, induite par une inflammation systémique, peut être la cause de troubles de la mémoire hippocampo-dépendante par l'intermédiaire de la signalisation à l'IL-1β et des CDB induites par la cytokine.

Nos travaux apportent de nouveaux éléments de réponse aux questions posées au cours de ma thèse mais des zones d'ombres persistent sur certains processus. Dans la suite du chapitre, nous discuterons donc des résultats obtenus durant ce travail de thèse mais également des nouvelles pistes d'études qui pourraient se dégager de ces découvertes. Je discuterai également des hypothèses de mécanismes ou processus qui pourraient lever ces zones d'ombres en me basant sur nos résultats et la bibliographie. Puis, dans une dernière partie nous évoquerons les perspectives thérapeutiques que pourraient offrir la découverte de nouveaux acteurs de la régulation épigénétique de la physiologie neuronale.

II. DISCUSSION

1. LES CASSURES DOUBLE-BRIN : L'ACCELERATEUR ET LE FREIN DE LA REPLICATION DU BODV ?

L'objectif de cette partie n'est pas de paraphraser la discussion du manuscrit de la publication mais de revenir sur les éléments importants de ce nouveau mécanisme de régulation de la réplication du BoDV, de compléter certaines hypothèses et d'exprimer mon point de vue sur certains aspects. Dans cette partie nous essaierons également de développer des pistes d'études qui pourraient être mises en place pour mieux appréhender les mécanismes encore non décrits.

Quelle est la relation entre les vSPOT et les cassures double-brins ?

De nombreux virus forment des usines de réplication dans les cellules infectées, en détournant ou non les membranes des organites pour former des cryptes à l'abri de la détection par le système immunitaire inné (Nevers *et al.*, 2020). Des virus à ADN comme les *Herpesviridae* ou les *Polyomaviridae* peuvent former ces usines de réplication dans le noyau (Charman & Weitzman, 2020). Alors que ces dernières, sont localisées dans le cytoplasme dans le cas de cellules infectées par des virus à ARN comme les *Mononegavirales* avec *Ebolavirus* (virus Ebola) ou les *Rhabdovirus* (virus de la rage) (Hoenen *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2009). Dans ces exemples d'infection, les usines de réplication ne mettent pas à contribution de membranes cellulaires. Ces usines sont globalement toutes structurées de la même façon. Elles prennent la forme de foyers ou corps d'inclusion regroupant le génome viral, des transcrits viraux et des protéines structurales ou non structurales virales. Les fonctions de ces structures sont de regrouper à un même endroit les facteurs nécessaires à la réplication du virus, tout en empêchant la détection des éléments géniques viraux, considérés comme étrangers, par les PRR intracellulaires. Le BoDV forme aussi de telles structures, dans le noyau des neurones infectés, qui ont été appelées vSPOT (Matsumoto *et al.*, 2012). L'organisation du vSPOT se rapproche de celle des corps de Negri qui sont les usines de réplication virale d'autres *Mononegavirales*, les *Rhabdovirus*, dans les neurones. Dans ces structures, une capsule de nucléoprotéine N et de phosphoprotéine P entoure les ARN viraux. Les corps de Negri des *Rhabdovirus* sont localisés dans le cytoplasme et utilisent les microtubules pour former de nouveaux corps d'inclusion afin

de favoriser la production de nouveaux virions (Nikolic *et al.*, 2017). Au contraire, comme nous avons pu le montrer dans notre étude, les vSPOT de BoDV sont localisés dans le noyau des neurones infectés, en étroite interaction avec la chromatine et préférentiellement localisés au niveau de CDB.

Il serait maintenant intéressant d'étudier les processus qui font que les vSPOT sont étroitement liés aux CDB, *via* la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P. Nous savons déjà que la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P peuvent interagir avec des protéines de l'architecture de la chromatine dont HMGB1, des histones de cœur du nucléosome, mais également avec au moins une protéine qui peut participer à certains mécanismes de réparation des CDB, PARP-1 (Matsumoto *et al.*, 2012). L'évolution de l'interaction avec la chromatine a été surtout étudiée sous l'angle de la division cellulaire. En effet, Matsumoto et *al.* ont travaillé sur un modèle de lignée cellulaire OL et pas avec des neurones post-mitotiques, qui sont les premières cibles de l'infection naturelle par le BoDV.

Une étude d'interactome de la nucléoprotéine N et de la phosphoprotéine P est donc d'abord nécessaire afin de confirmer ou d'infirmer les interactions déjà identifiées dans des cellules mitotiques, et d'identifier de nouvelles relations, mais cette fois-ci dans des cultures primaires de neurones. Ce travail commence à se mettre en place avec l'équipe de Thibault Crépin et Rob Ruigrok de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. La première étape serait donc de déterminer quelles seraient, parmi les interactions identifiées, celles nécessaires pour induire l'augmentation des niveaux de CDB. Il serait donc intéressant de travailler avec des virus recombinants qui exprimeraient des protéines virales mutées, pour voir si ces virus sont capables d'induire une augmentation des niveaux de CDB, de former des vSPOT et de se répliquer (Perez *et al.*, 2003). Nous disposons déjà au laboratoire d'un virus recombinant dont la phosphoprotéine P est mutée sur son site d'interaction avec HMGB1 (P_{E84N}). Il a été montré que ce virus recombinant arrive à former des vSPOT mais ne peut ni se lier à la chromatine, ni se répliquer (Matsumoto *et al.*, 2012). A partir de ces résultats et des résultats que nous avons obtenus, il est concevable que le virus ne soit pas à l'origine des cassures en soi, mais qu'il se fixerait sur des cassures déjà préexistantes, potentiellement par l'intermédiaire de HMGB1. Cette fixation sur les CDB conduirait alors à leur stabilisation et au blocage de leur réparation. Aussi, les interactions de la nucléoprotéine N et de la phosphoprotéine P avec les protéines cellulaires seraient suffisantes pour stabiliser ces cassures. Nous avons également observé que l'expression isolée de la nucléoprotéine N et de la phosphoprotéine P conduisait à une augmentation plus importante du nombre de CDB par rapport à l'infection. Nous pensons que dans le cadre de l'infection, il existe d'autres mécanismes qui compensent ou évitent une

augmentation trop importante de CDB, ce qui est en accord avec le fait que le BoDV n'induit pas de mort cellulaire.Nous pensons aussi que ce rôle pourrait être exercé par la X, dont les propriétés neuroprotectrices ont déjà été caractérisées (Szelechowski *et al.*, 2014). Aussi, les interactions entre les protéines N et P, qui ont lieu dans le cadre de l'infection pourraient atténuer leurs effets sur l'augmentation des niveaux de CDB, en masquant des sites d'interaction avec des facteurs cellulaires.

Les expériences d'induction des cassures avec l'étoposide vont aussi dans le sens d'une CDB préexistante qui sert de support au vSPOT. En effet, l'induction seule de CDB permet de recruter plus de vSPOT. Néanmoins, nos expériences n'ont finalement regardé que le recrutement de la nucléoprotéine N. On ne peut donc pour le moment pas exclure que ce que nous avons observé, soit juste des amas de protéines N, et non pas la structure organisée qu'est le vSPOT. Afin de confirmer que les cassures recrutent bien les vSPOT, nous réaliserons un double marquage N et P après traitement de nos cultures à l'étoposide, pour vérifier que l'augmentation des foyers de marquage de la N correspond également au marquage de la P. Pour confirmer l'hypothèse d'un recrutement des vSPOT sur les CDB, nous pourrions également utiliser le modèle de virus recombinant étiqueté sur la protéine P par une tetracystéine, mis au point au laboratoire, pour faire un suivi en temps réel par imagerie (Charlier *et al.*, 2013). Ainsi, nous pourrions reprendre le même protocole que pour mon projet de thèse, à savoir, infecter d'abord des neurones primaires matures à 7 jours de culture puis traiter quelques jours après avec de l'étoposide pour induire des CDB. En parallèle, l'évolution et la dynamique des vSPOT seraient suivies par microscopie confocale.

Malgré ce besoin de valider notre hypothèse plus avant, la forme en anneau que prend la protéine N nous conforte dans l'interprétation de nos résultats. En effet, ce marquage est caractéristique des vSPOT, lors des analyses par microscopie confocale à super résolution.

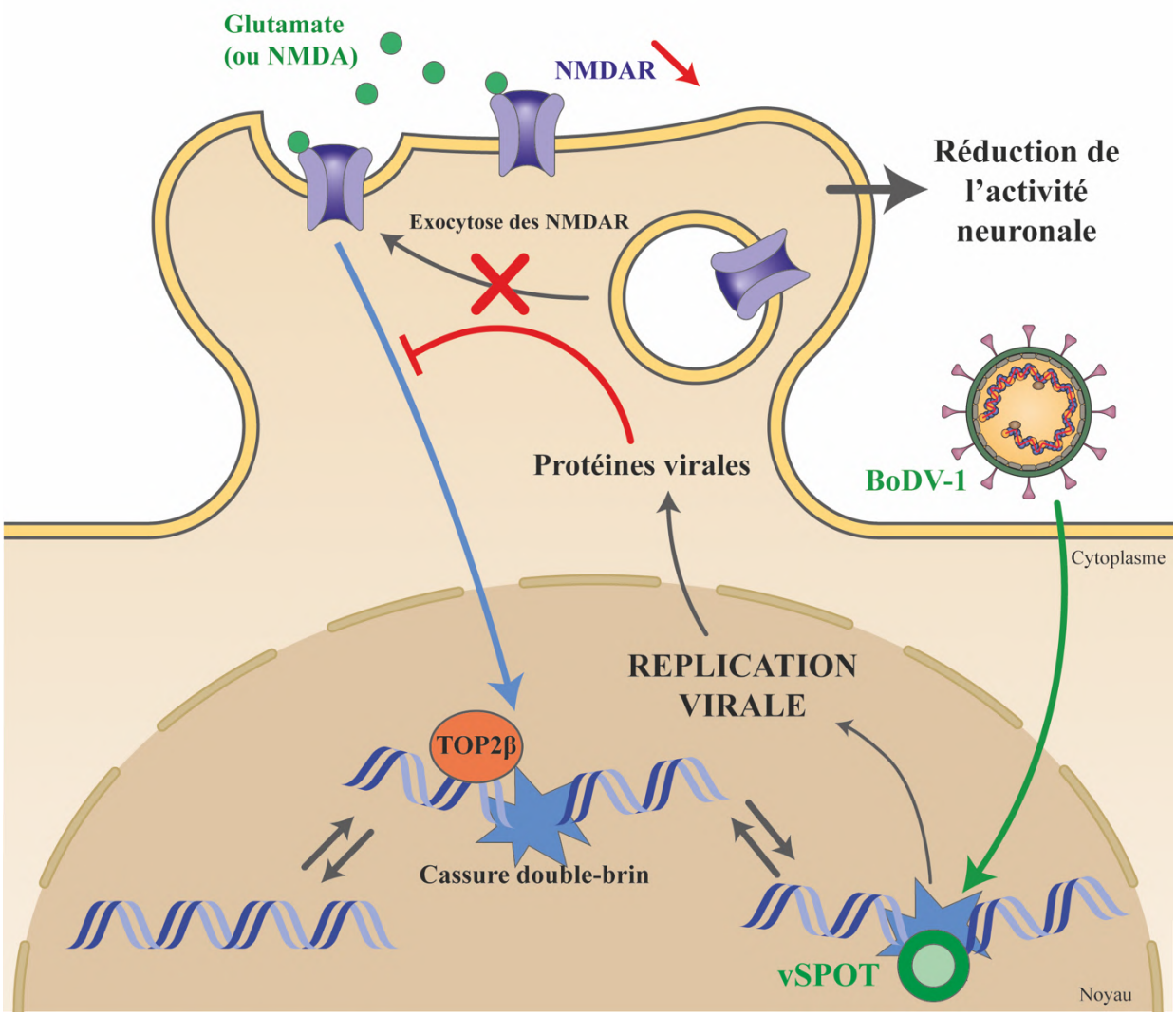


Figure 47 : Schéma hypothétique du détournement des cassures double-brins par le BoDV pour moduler sa propre réplication.

Le BoDV pourrait former des vSPOT sur les CDB induites par l'activité neuronale. Cette fixation lui permettrait de favoriser sa réplication. Un, ou des, facteur(s) viral(ux) induirai(en)t l'inhibition de l'expression à la surface des NMDAR. Cette diminution de NMDAR serait associée à une diminution de la génération de CDB dépendantes de l'activité, réduisant ainsi la réplication virale. Le virus serait donc en capacité de moduler sa propre réplication en inhibant la génération des CDB qui lui permettent de se répliquer. Les conséquences de cette altération d'une voie importante pour la plasticité neuronale, conduirait à la réduction de l'activité neuronale des neurones infectés.

Les cassures double-brin sont-elles au centre d'une boucle de rétrocontrôle de la réplication du BoDV ?

Au cours de l'évolution, plusieurs stratégies ont été sélectionnées pour permettre aux virus de favoriser leur réplication et leur survie : une infection rapide avec une importante production de particules virales ou alors une infection persistante ou latente avec une production très contrôlée de particules virales, le but étant de se faire discret.

Le BoDV a opté pour la deuxième stratégie. Comme je vous l'ai décrit dans l'introduction, le BoDV est un virus qui persiste à vie chez son hôte et sans induire de mort neuronale. Cela peut s'expliquer, en effet, par la lente co-évolution du virus avec son hôte puisque l'on retrouve des séquences d'anciens *Bornaviridae* dans le génome des Mammifères (Horie *et al.*, 2010). Son échappement à la détection est tel qu'il n'existe pas à peu de virémie ou de présence de virions dans les fluides corporels, et pas de détection possible par sérologie. De plus, à l'échelle cellulaire, sa dissémination probable de proche en proche, sans sortir des cellules, et juste par contact de cellules voisines, va aussi dans le sens d'une infection discrète. Cela suppose que le virus est capable de contrôler finement sa réplication en l'absence de phase de latence, qui est contingente de l'absence de production d'éléments viraux. Un premier mécanisme de rétrocontrôle du virus sur sa propre réplication a été mis en évidence au laboratoire par Bonnaud et *al.*. Le virus peut inhiber une HAT qui conduit à l'inhibition de sa réplication. Mes résultats proposent également un nouveau mécanisme de rétrocontrôle de la réplication du virus *via* les CDB. L'hypothèse est que des CDB physiologiques préexistantes, induites par la stimulation neuronale (ou autre), servent de plateforme pour le recrutement et la réplication virale. Par l'intermédiaire d'un mécanisme et de facteurs viraux non encore caractérisés, le virus inhibe l'expression à la surface des neurones des NMDAR dont la stimulation induit les CDB activités-dépendantes. Il en découle la diminution du niveau de CDB activités-dépendantes, donc à une diminution du recrutement de nouveaux vSPOT, et donc à un frein de la réplication virale. Avec la diminution de l'expression des facteurs viraux, le blocage de l'expression à la surface des NMDAR serait levé, et la stimulation neuronale pourrait de nouveau induire des cassures (Figure 47). Les questions qui se posent maintenant sont : (1) est-ce que les CDB dépendantes de l'activité sont nécessaires pour la réplication virale ? (2) Quel(s) facteur(s), mécanisme(s) interviennent dans le blocage de l'expression à la surface des NMDAR ?

Pour répondre à la première question, il est possible d'inhiber l'activité spontanée des neurones en culture en utilisant des traitements pharmacologiques. La tétrodotoxine (TTX) bloque les pores des canaux sodium voltage-dépendants, empêchant ainsi le passage de l'influx nerveux sans mettre en danger la survie neuronale. Ainsi, des cultures primaires de neurones traitées par de la TTX n'ont plus d'activité spontanée (Puopolo *et al.*, 2007). En utilisant cette drogue, nous pourrions d'abord traiter des neurones, puis les infecter et suivre comment l'infection progresse en comparaison d'un réseau neuronal infecté mais non traité.

Pour la deuxième question, notre hypothèse est que le blocage de l'expression à la surface des NMDAR se fait par l'intermédiaire de la phosphoprotéine P. D'abord, on peut exclure une diminution de l'expression des NMDAR car, dans nos expériences de quantification, il y avait même davantage de sous-unités de NMDAR total. Cela peut s'expliquer par des effets compensatoires, en réponse à l'absence de NMDAR à la surface, qui conduisent à l'augmentation de l'expression à l'échelle du gène. Mais ce résultat devra être confirmé, par exemple, par analyse des niveaux des transcrits des gènes codant les NMDAR par *RT-qPCR*. Il a été montré au laboratoire que l'inhibition de la phosphorylation de SNAP25 et MARCKS par la phosphoprotéine P conduisait à une réduction de l'entrée de calcium dans les neurones infectés suite à une dépolarisation (Prat *et al.*, 2009). D'abord, les principaux canaux responsables d'une entrée de calcium dans la cellule suite à une dépolarisation sont les NMDAR (Sun *et al.*, 2018). De plus, la protéine SNAP25, une fois phosphorylée, forme avec d'autres protéines, le complexe SNARE, qui a été impliqué dans la fusion de vésicules contenant des NMDAR, à la membrane cellulaire (Gu & Huganir, 2016). En recoupant ces informations, nous pouvons émettre l'hypothèse que le phosphoprotéine P, en inhibant la phosphorylation de SNAP25, perturbe le trafic des vésicules contenant les récepteurs NMDA et bloquerait ainsi leur expression à la surface des neurones infectés. Ainsi pour tester cette hypothèse, nous pourrions exprimer de façon isolée la phosphoprotéine P pour déterminer son implication dans la perturbation de l'expression à la surface des NMDAR. Aussi, si l'hypothèse est vérifiée, nous disposons au laboratoire d'un mutant de la phosphoprotéine P, P_{AA}, qui a perdu son effet sur SNAP25. Ce mutant pourrait être exprimé à l'aide de vecteurs lentiviraux dans des neurones. Ceci nous permettrait d'analyser les niveaux de NMDAR à la surface et voir si les niveaux sont à nouveau comparables à ceux des neurones non infectés.

La perturbation des fonctions neuronales peut-elle être associée à l'augmentation des niveaux de cassures ?

Dans le cadre de l'infection, nous avons observé une augmentation faible des niveaux de cassures. Or il a déjà été montré que même une augmentation faible de CDB est suffisante pour perturber le fonctionnement neuronal et le comportement (Suberbielle *et al.*, 2013, 2015). Il n'est donc pas surprenant que l'augmentation des CDB par l'infection puisse perturber les fonctions neuronales.

Jusqu'à présent, il n'avait pas été détecté d'effets de l'infection virale sur l'activité spontanée des neurones (Volmer *et al.,* 2007). Une nouvelle génération de dispositifs permet d'enregistrer l'activité neuronale à l'échelle du neurone unique de manière non invasive et est beaucoup plus sensible que les puces MEA précédemment utilisées. Ces dispositifs NEA (*nano electrode array*) que nous avons utilisés, ont été mis au point par nos collaborateurs du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (Toulouse) afin de pallier à ces limitations technologiques (Casanova *et al.,* 2018).Cette optimisation nous a donc permis de mettre en évidence une diminution l'activité spontanée à l'échelle du neurone unique infecté. Le dispositif a cependant quelques limites. En effet, la probabilité qu'un neurone se pose sur une électrode, lors de l'ensemencement, est assez faible et c'est finalement l'activité au niveau de prolongements qui est mesurée. Il serait aussi intéressant de regarder si l'expression isolée de la nucléoprotéine N ou de la phosphoprotéine P, augmentant les niveaux de CDB, est suffisante pour perturber l'activité neuronale spontanée.

Au laboratoire, il a été montré que l'expression de la phosphoprotéine P seule dans l'hippocampe de souris suffit à entrainer des troubles du comportement (Bétourné *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant dans un premier temps, de mesurer les niveaux de CDB dans les neurones de l'hippocampe de ces souris, et de tester également la nucléoprotéine N. De plus, nous pourrions exprimer la phosphoprotéine P dans l'hippocampe de souris du modèle iH2A.X KO, que nous avons à notre disposition, et voir si cela suffit à prévenir les effets de cette protéine sur le comportement.

Nous reviendrons plus tard dans la discussion sur un aspect, commun à mes deux axes de recherche, qui pourraient permettre de mieux identifier le lien entre CDB augmentées par le BoDV et les dysfonctions neuronales dépendantes de l'infection.

2. LA PERTURBATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN PAR L'INTERLEUKINE-1B, A L'ORIGINE DE TROUBLES DU COMPORTEMENT ?

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus ont, pour la première fois mis en évidence la perturbation d'un mécanisme épigénétique lors d'une neuroinflammation chronique. L'impact d'un traitement systémique chronique par de l'IL-1β sur les CDB neuronales serait impliqué dans les troubles du comportement observés. Cependant, certains résultats doivent être renforcés par la réalisation de cohortes supplémentaires. C'est pourquoi, je prendrai plus de temps à discuter les résultats que nous avons obtenus, plutôt que de proposer des pistes de recherche pour compléter ou affiner les processus que nous avons commencé à mettre en évidence.

Un impact de l'IL-1β chronique sur le comportement, dissociable d'un *sickness behavior syndrome* et d'une neuroinflammation importante ?

Tout d'abord, nous n'avons pour l'heure pas obtenu de résultats sur le dosage de l'IL-1β dans le sérum même si nous avons récupéré des échantillons de sang. En effet, nous sommes en train de mettre au point la procédure de mesure des niveaux circulants d'IL-1β par ELISA. Cependant nous sommes plutôt confiants sur la bonne diffusion de la cytokine, car des études précédentes ont vérifié l'activité à long terme de l'IL-1β sécrétée par les mini-pompes dans plusieurs systèmes (Koide *et al.*, 1995; Lippuner *et al.*, 1999; Goshen *et al.*, 2008). De plus, le phénotype des souris IL-1β, dont l'évolution des poids, lors des suivis réguliers suggèrent fortement que de l'IL-1β est infusée et qu'un état inflammatoire se met en place. Enfin, nous avons observé des différences claires sur le comportement entre nos deux groupes de souris dont la seule différence est le traitement par de l'IL-1β. Tous ces éléments tendent à montrer qu'il y a bien eu diffusion de la cytokine.

Comme j'ai pu le présenter dans l'introduction, une neuroinflammation aiguë se caractérise par un SBS comprenant un panel de symptômes de repli, d'isolement et d'une perte d'appétit. Nous avons pu observer ce qui s'apparente au SBS dans nos cohortes de souris dès les premiers jours après le début du traitement chronique par l'IL-1β (souris IL-1β). En effet, la courbe de suivi de poids a mis en évidence une perte de poids plus importante chez les souris IL-1β, significative à J2, par rapport aux souris traitées par la solution saline (souris saline).

De façon intéressante, les courbes de poids finissent par évoluer de la même façon et sur les derniers jours, les souris IL-1β ont le même poids que les souris saline. Les résultats obtenus sur les déplacements lors de l'EPM et du NPR montrent que les souris IL-1β ne présentent pas de troubles de la mobilité. Cependant, l'évaluation de l'anxiété semble montrer que les souris IL-1β présentent une anxiété réduite par rapport aux souris saline. A titre de comparaison, on peut retrouver ce phénomène de diminution d'anxiété ou de désinhibition dans des modèles de souris Alzheimer, mais le temps passé dans le bras ouvert est alors bien plus important que ce que nous pouvons observer avec notre modèle (Griñán-Ferré *et al.*, 2016; Watt *et al.*, 2020**).** Pour l'instant, il serait prématuré de conclure mais, à la vue de la variabilité des deux groupes, nous avons considéré que les souris étaient globalement normo-anxieuses et ne souffraient pas de prostration. Des études ont mis en évidence que chez la souris, le SBS se caractérisait aussi par des troubles de la mémoire (Sparkman *et al.*, 2005; Skelly *et al.*, 2013; Czerniawski & Guzowski, 2014). Cependant, ces résultats sont à nuancer car durant le SBS les souris souffrent également d'anxiété et de prostration, ce qui peut poser des problèmes dans l'interprétation des résultats lors de tests nécessitant de l'exploration et des déplacements. Elles auront donc moins tendance à s'engager dans une tâche, et il est difficile alors de déterminer si les souris ne se souviennent plus ou si elles ne veulent tout simplement pas bouger. Nous avons également analysé les conséquences du traitement chronique par de l'IL-1β sur les populations de gliales et sur la neurogenèse. En effet, comme je l'ai mentionné dans l'introduction, la neuroinflammation peut s'accompagner de l'activation des cellules gliales avec leur prolifération mais également d'une perturbation de la neuronogenèse, y compris dans le SBS. Un premier travail avait mis en évidence qu'un traitement chronique par de l'IL-1β, dans les mêmes conditions, pouvait conduire à une diminution de la neurogenèse (Goshen *et al.*, 2008). Ces évènements de la neuroinflammation, surtout s'ils deviennent chroniques, caractérisent le développement d'une réaction neuroinflammatoire massive pouvant aboutir à la neurodégénérescence. Ainsi, nos premiers résultats semblent montrer que, dans notre modèle, les perturbations de la mémoire chez les souris IL-1β ne sont associées ni à une astrogliose, ni à une microgliose et ni à une diminution de la neurogenèse. Pour les populations gliales, nous n'avons pas réalisé d'analyses fines de la morphologie des cellules afin de déterminer leur état (actif ou inactif). Cependant, nous n'avons pas remarqué de morphologies caractéristiques d'un état activé des cellules (forme amiboïde de la microglie, etc…) lors des différents comptages.

Les expériences du NPR nous ont permis de montrer que les souris IL-1β présentaient des défauts de la mémoire spatiale hippocampo-dépendante. En effet le NPR est un test qui permet d'évaluer les fonctions de l'hippocampe.

Le test repose sur une modification de la localisation de l'objet qui implique donc une mémoire spatiale qui est encodée par l'hippocampe. Le temps que nous avons choisi, et qui est communément choisi pour ce test (3 h), est le temps suffisant pour que l'information prise durant l'étape d'habituation soit consolidée dans l'hippocampe, sans impliquer plus de régions du cerveau en aval. Le NOR quant à lui, implique plusieurs régions du cerveau, dont le cortex, et le rôle de l'hippocampe est toujours controversé (Antunes & Biala, 2012)**.** La méthode que nous avons choisie est de conserver le même contexte entre le NPR et le NOR et de ne changer qu'un seul élément à savoir l'objet. Cette organisation suggère, d'après ce qui est connu, que le changement de contexte entre les deux phases de tests n'est pas suffisant pour impliquer l'hippocampe. Ainsi, les régions impliquées correspondraient à de la mémoire de reconnaissance d'objet ou de la mémoire générale, sans contexte spatial, étant donné que rien n'a « bougé » (Denninger *et al.*, 2018; Vogel-Ciernia & Wood, 2014). Afin de confirmer ces résultats, nous avons commencé à mettre en place des expériences en utilisant le labyrinthe de Barnes qui permet également d'étudier plus finement toutes les étapes de l'apprentissage à la mémoire spatiale et sa plasticité. En effet, ce test nous permettra d'analyser les capacités de la mémoire de travail, la consolidation de la mémoire spatiale, la mémoire à long terme et la capacité de transformer une mémoire en une autre. Le labyrinthe de Barnes repose sur une tâche spatiale dans laquelle l'animal est entrainé à rejoindre un abri caché, guidé par des indices visuels. Dans cette tâche, la mémoire est évaluée par la latence et la distance parcourue pour atteindre la cible, le temps dans le cadrant de la cible et le nombre d'erreurs (O'Leary & Brown, 2012).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent donc que, les effets du traitement chronique par de l'IL-1β sur la mémoire hippocampo-dépendante ne sont pas imputables à un SBS prolongé ni associés à une neuroinflammation massive.

La signalisation induite par le récepteur IL-1R1 dans les neurones, un rôle dans les troubles du comportement induits par l'exposition chronique à l'IL-1β ?

L'IL-1β a été impliquée comme un des acteurs de la neuroinflammation chronique. Cependant, cette cytokine n'est pas la cause de toutes les perturbations observées, et un focus a été particulièrement mis sur l'impact de l'activation de la microglie et de son arsenal de médiateurs. Dans le système que nous utilisons, nous observons des effets sans modifications apparentes de la microglie.

Nous avons donc isolé des perturbations qui semblent dépendantes directement de l'IL-1β. L'IL-1β, surtout si elle est infusée en systémique, peut impliquer différents intermédiaires avant d'avoir un effet central au niveau du SNC. C'est pourquoi nous avons étudié précisément le rôle de l'IL-1β directement au niveau des neurones de l'hippocampe dont les fonctions sont altérées après traitement chronique par la cytokine. Des modèles très récents de mutants de délétion du récepteur IL-1R1 spécifiquement dans certains types cellulaires du SNC ont déjà été publiés mais sont non inductibles (Liu *et al.*, 2019). Or, le rôle de l'IL-1β, en conditions physiologiques pour le développement du cerveau est bien connu, et ce type de mutation peut donc altérer le développement et le fonctionnement normal du cerveau. Aussi, des modèles de souris déficientes IL-1R1 total présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (Takemiya *et al.*, 2017). L'originalité du modèle que nous avons utilisé, est que nous pouvons induire la délétion du gène d'intérêt, spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe, à l'âge adulte. Cette approche permet ainsi de s'affranchir des conséquences que pourrait avoir la délétion de ces gènes lors du développement de l'animal. Ces modèles uniques n'ont, à notre connaissance, encore jamais été utilisés ni publiés dans la littérature. De plus, dans notre modèle, l'induction de la délétion des récepteurs IL-1R1 spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe n'a pas d'impact sur la mémorisation. La validation de la délétion spécifique du gène est en cours de réalisation par les techniques d'immunohistochimie mais également par *RT-qPCR*.

D'abord, les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que l'impact du traitement chronique par de l'IL-1β sur la mémoire est directement lié à la signalisation de la cytokine, via son récepteur IL-1R1 dans les neurones excitateurs de l'hippocampe. De plus, nos résultats semblent également montrer que, même infusé en systémique, l'effet de l'IL-1β est central et direct sur les neurones, sans le relais d'autres médiateurs.

Les CDB et leur signalisation sont-elles des acteurs des troubles de la mémoire après une exposition chronique à l'IL-1β ?

Mon projet s'intéressait à explorer l'implication d'un nouveau mécanisme épigénétique pour les neurones qui sont les CDB. Nous avons mis en évidence que le traitement chronique par de l'IL-1β conduisait à une augmentation du nombre de neurones ayant au moins une CDB dans les différentes régions de l'hippocampe. Le nombre de neurones ayant des CDB peut paraitre limité, mais il a déjà été montré dans les précédents travaux de Suberbielle et *al.* que

même une augmentation limitée des CDB est suffisante pour induire une perturbation des fonctions cognitives (Suberbielle *et al.*, 2013).

Comme je l'ai souligné dans l'introduction, il est pour l'heure impossible techniquement de prévenir la génération de cassures et d'autre part, les modèles existants présentent des limites trop importantes pour notre étude (Celeste *et al.*, 2003; Weyemi *et al.*, 2018). Une des stratégies mises en place pour étudier les CDB, est donc de déléter le gène codant pour H2A.X dont la phosphorylation est une des étapes précoces de détection et de signalisation de la CDB. Cette délétion a donc pour conséquence de casser une partie de la signalisation induite par la génération de CDB qui peut donc être perçue par la cellule comme une « absence » de cassures. Nous avons alors mis en place un modèle de souris, où la délétion de ce gène peut être induite spécifiquement dans les neurones excitateurs de l'hippocampe et directement à l'âge adulte. Les souris iH2A.X KO ne présentent pas de troubles particuliers de la consolidation de la mémoire spatiale ni même d'anxiété, montrant que H2A.X est dispensable pour le processus que nous étudions. Nous avons observé une légère astrocytose, dans le traitement chronique par de l'IL-1β des souris non déficientes. Or nous n'avons pas observé d'effets, dans les souris sauvages, avec le traitement à la cytokine. Nous pensons donc que dans des conditions équivalentes, il ne devrait pas y avoir non plus d'astrocytose. C'est pourquoi, nous souhaiterions refaire de nouvelles cohortes avant de pouvoir discuter de ce résultat.

Ensuite, les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent, de façon surprenante, que la délétion de H2A.X prévient les troubles de la mémoire observés après le traitement chronique par de l'IL-1β. Ainsi, nous avons mis pour la première fois en évidence que les effets délétères sur la mémoire de l'IL-1β sont dépendants de la signalisation épigénétique liée à la génération de CDB spécifiquement par les neurones excitateurs de l'hippocampe.

Encore une fois, la limite de ce modèle est que l'on ne prévient pas la génération de cassures et n'est pas le reflet direct de la phosphorylation de H2A.X en soi. De plus, au-delà du fait qu'une CDB entraîne la phosphorylation de H2A.X, la CDB est aussi le lieu d'une multitude de modifications épigénétiques différentes qui pourraient jouer un rôle dans la perturbation de la mémoire (Rossetto *et al.*, 2010). Aussi, outre la modification par phosphorylation de H2A.X, il est possible que H2A.X subissent une modification épigénétique encore inconnue qui serait attisée lors d'une CDB ou de la stimulation par l'IL-1β.

Quels sont les mécanismes sous-jacents à l'induction des cassures double-brin par l'IL-1β ?

Dans les expériences *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence que les niveaux de CDB étaient augmentés dans des neurones primaires d'hippocampe de souris. Le modèle *in vitro* va nous permettre d'essayer de déterminer quels sont les mécanismes mis en jeu par la signalisation IL-1β pour induire des CDB et *in fine*, perturber les fonctions du neurone. Nous avons utilisé des doses qui correspondent à des doses considérées comme pathologiques mais sub-toxiques pour les neurones (Ye *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2011). Cependant, nous avons également testé la dose de 100 ng/mL mais nous avons observé, à cette concentration, de l'excitotoxicité et de la mortalité neuronale nous donnant ainsi la limite à ne pas dépasser (données non montrées).

En conditions physiologiques, les CDB sont induites par la stimulation des iNMDAR. En conditions pathologiques, durant la maladie d'Alzheimer, la stimulation des récepteurs eNMDAR conduit à l'augmentation de CDB, mais également bloque leur réparation en induisant la dégradation du facteur de réparation BRCA1 (Suberbielle *et al.*, 2013, 2015). En outre, nous savons qu'en conditions physiologiques, les récepteurs IL-1R1 peuvent interagir avec les NMDAR en se liant à la sous-unité GluN2B de ce dernier, spécifique des eNMDAR, au niveau de la synapse. Or le traitement de cultures primaires de neurones par de l'IL-1β déclenche le recrutement de nouveaux récepteurs IL-1R1 aux niveaux des synapses qui interagissent avec les eNMDAR (Gardoni *et al.*, 2011). Enfin, des expériences préliminaires que nous avons réalisées suggèrent qu'un traitement par de l'IL-1β de cultures primaires de neurones conduit à une diminution des niveaux de la protéine BRCA1 (données non montrées). Nous devons d'abord confirmer ces résultats puis nous avons également commencé à quantifier les niveaux de BRCA1 dans des extraits protéiques d'hippocampes issus des souris traitées. Ainsi, nous avons pu dégager une hypothèse intéressante de ces données qui est que le traitement de neurones par de l'IL-1β pourrait, par l'intermédiaire de l'interaction IL-1R1/eNMDAR, activer la signalisation en aval des eNMDAR et induire la dégradation de BRCA1 et l'augmentation des CDB. Pour tester notre hypothèse, il existe des inhibiteurs spécifiques des sous-unités GluN2B comme l'ifenprodil (Schreiber *et al.*, 2019). Nous souhaiterions donc exposer des cultures primaires de neurones, prétraitées avec de l'ifenprodil, à de l'IL-1β pour analyser les niveaux de CDB. L'absence d'augmentation des niveaux de CDB suite au traitement par de l'IL-1β démontrerait que les eNMDAR sont un intermédiaire de

l'augmentation des CDB par l'IL-1β, et qu'une des causes probables de cette augmentation est probablement la dégradation de BRCA1. Aussi, nous souhaiterions contrôler, *in vitro*, que des cultures primaires de neurones d'hippocampes issus de souris iIL-1R1 KO traitées par de l'IL-1β n'aient pas de diminution des niveaux de BRCA1.

3. DEUX INDUCTEURS DIFFERENTS PERTURBENT LES CASSURES DOUBLE-BRIN, OÙ SONT CES CASSURES ?

Ainsi, mon travail de thèse a permis de découvrir deux inducteurs différents de perturbation des niveaux de CDB dans les neurones. La question, à laquelle nous souhaiterions maintenant répondre, est de savoir où sont localisées ces CDB sur le génome et quel est leur impact épigénétique sur l'expression de gènes.

Les premières études, qui ont mis en évidence le rôle des CDB dans la plasticité neuronale, ont montré que l'augmentation des cassures suite à une stimulation était limitée et que la localisation de ces cassures n'était pas aléatoire (Suberbielle *et al.*, 2013; Madabhushi *et al.*, 2015). Aussi, ces CDB dépendantes de l'activité conduisaient à augmenter l'expression d'un nombre limité de gènes. De façon intéressante, ces gènes codaient pour des facteurs de transcription précoces participant à la mise en place de la plasticité neuronale. Les auteurs ont donc voulu savoir où ces cassures étaient localisées. En utilisant la technique d'immunoprécipitation de chromatine suivi d'un séquençage (ChIP-Seq) dirigée contre γH2A.X, ils ont montré que les CDB étaient majoritairement localisées au niveau des gènes codant les facteurs de transcription précoces identifiés précédemment. Nous avons donc commencé à mettre en place la procédure de ChIP-Seq sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat ou de souris, en utilisant nos modèles d'induction de CDB, à savoir : le BoDV et l'IL-1β. Nous souhaiterions obtenir plusieurs informations à partir de ces expériences : d'abord déterminer si les cassures sont localisées aux mêmes endroits que lors de la stimulation physiologique ou bien si d'autres régions sont touchées. Cela peut permettre également de répondre à la question si ces nouvelles CDB se localisent de manière aléatoire sur le génome ou si elles se trouvent à des endroits précis. Aussi, nous souhaiterions savoir si, entre l'augmentation des CDB par le BoDV et l'IL-1β, la localisation des cassures est identique ou différente. En effet, si la localisation des CDB concernait les mêmes sites géniques quel que

soit l'inducteur, cela signifierait que ces « *hot spots* » de cassures jouent une rôle pivot pour la fonction neuronale, où convergent de nombreux inducteurs pathologiques.

Enfin, nous souhaiterions étudier les gènes ciblés par les CDB induites par les conditions pathologiques, pour savoir si leur expression est modifiée dans ces conditions et si cette modification d'expression peut être associée aux dysfonctionnements neuronaux ou aux troubles comportementaux observés dans chaque condition.

III. PERSPECTIVES

Nos résultats sont donc très encourageants dans la découverte de nouveaux mécanismes qui pourraient être perturbés dans de nombreuses maladies neurologiques, qu'elles soient infectieuses, neurodéveloppementales, neuropsychiatriques ou neurodégénératives. Ils ont permis de mettre en évidence deux conditions pathogènes capables d'altérer un même mécanisme épigénétique dans les neurones. En effet, dans les deux cas, l'augmentation des niveaux des CDB est associée à des troubles des fonctions neuronales ou des fonctions cognitives. Dans le cas du BoDV, elles participent même à la pathogenèse en permettant l'établissement d'une infection persistante. Ainsi, les CDB pourraient apparaitre comme un mécanisme central au fonctionnement du neurone dont la perturbation serait la cause des dysfonctions observées dans différentes conditions pathologiques.

De manière fascinante, les deux conditions pathologiques chroniques ne sont pas caractérisées par la mort neuronale. Dès lors, les dérégulations de la réponse aux CDB dans les neurones pourraient être réversibles, ce qui les rend intéressante en tant que cibles thérapeutiques. Ces dernières années ont vu l'émergence de pistes thérapeutiques visant d'autres modifications épigénétiques. De nombreux efforts de recherche ont été positionnés sur l'utilisation des inhibiteurs de HDAC puisqu'il est généralement observé une hypoacétylation globale des histones dans les maladies neurologiques (Abel & Zukin, 2008). Par exemple, il a été montré qu'une injection quotidienne de butyrate de sodium, un inhibiteur de HDAC, pendant 4 semaines permet de restaurer la mémoire à long terme dans un modèle de neurodégénérescence chez la souris (Fischer *et al.*, 2007). Les limites de ces traitements sont le manque de spécificité de ces molécules qui peuvent avoir des effets secondaires pléiotropiques. Une autre limite de ces molécules est leur capacité à franchir la BHE, lors d'un traitement en systémique. C'est pourquoi, de nouvelles approches plus ciblées ont été développées en utilisant des systèmes de plateformes liant l'ADN fusionnées à des enzymes de modifications de la chromatine. Ces plateformes incluent les protéines à « doigts de zinc » ou le système

CRISPR/Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9)* (Berson *et al.*, 2018). Dans une étude, une plateforme de protéines à « doigts de zinc » liée à un activateur transcriptionnel fort d'origine virale (VP64) a été utilisé pour restaurer les capacités mnésiques dans un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer (Bustos *et al.*, 2017). Cette plateforme est capable de s'hybrider au promoteur du gène *Dlg4* codant PSD95, une protéine impliquée dans la structure des synapses et dont l'expression est diminuée dans la maladie d'Alzheimer. La protéine VP64 a permis le recrutement d'HAT conduisant à l'acétylation de la région promotrice du gène, l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription du gène.

A notre sens, si nous devions choisir une stratégie thérapeutique en lien avec la réponse aux CDB, il s'agirait de promouvoir la réparation de l'ADN dans les neurones. En effet, les évidences s'accumulent sur le rôle de la production transitoire des CDB dans les mécanismes de l'apprentissage et le maintien de la mémoire, rendant délicat le ciblage thérapeutique de la production et la détection des cassures. Ici, nous avons montré que la présence de l'histone H2A.X n'est pas nécessaire pour la consolidation de la mémoire spatiale. Néanmoins nous n'avons pas encore caractérisé complètement le comportement de ces souris et le maintien de leur mémoire à très long-terme. Il est donc trop tôt pour affirmer que l'invalidation d'H2A.X dans les neurones serait sans conséquences délétères sur la fonction cérébrale.

Promouvoir une réparation correcte des CDB neuronales, afin de prévenir leur accumulation dans le temps, semblerait un objectif plus rationnel dans une stratégie thérapeutique mais n'est pas sans difficultés conceptuelles. En effet, il a été montré que la surexpression de facteurs de réparation de l'ADN dans les cellules mitotiques est mutagène et carcinogène (Chakraborty *et al.*, 2018; Shimizu *et al.*, 2012). Ainsi, une stratégie de promotion de la réparation devra utiliser une technique qui serait sélective des neurones. Ensuite, il s'agirait d'identifier quel facteur de réparation cibler. BRCA1 émerge ces dernières années comme une cible intéressante puisque ses niveaux sont directement liés aux capacités cognitives et son défaut chronique, à la neurodégénérescence. La surexpression de BRCA1 dans l'hippocampe semble prévenir notamment les séquelles neurologiques d'un syndrome d'ischémie/reperfusion (Xu *et al.*, 2018). Il serait néanmoins prématuré, à ce stade de conclure sur le réel bénéfice de la présence en quantité accrue de ce facteur de réparation à long-terme, notamment dans le cas du cerveau au cours du vieillissement. En effet, le turnover de BRCA1 repose sur sa dégradation par le protéasome dans le neurone (Suberbielle *et al.*, 2015). Du fait que le fonctionnement du protéasome est fragilisé au cours du vieillissement, la surexpression d'une protéine qui ne serait pas correctement dégradée semble constituer une stratégie risquée.

Finalement, une meilleure compréhension des mécanismes et des voies impliquées dans les perturbations de la réponse aux CDB dans les neurones est nécessaire. Ces recherches fondamentales ouvriront alors la porte vers la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques communes à de nombreuses conditions pathologiques.

Bibliographie

_____A_____

Abdulaal WH, Walker CR, Costello R, Redondo-Castro E, Mufazalov IA, Papaemmanouil A, Rothwell NJ, Allan SM, Waisman A, Pinteaux E & Müller W (2016) Characterization of a conditional interleukin-1 receptor 1 mouse mutant using the Cre/LoxP system. *Eur. J. Immunol.* **46:** 912-918

Abel T & Zukin RS (2008) Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8:** 57-64

Akbarian S, Beeri MS & Haroutunian V (2013) Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol.* **70:** 711-718

Al-Onaizi M, Al-Khalifah A, Qasem D & Elali A (2020) Role of microglia in modulating adult neurogenesis in health and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **21:** 1-27

Allfrey VG, Faulkner R & Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States* **51:** 786-794

Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Blasdell KR, Briese T, Brown PA, Bukreyev A, Balkema-Buschmann A, Buchholz UJ, Chabi-Jesus C, Chandran K, Chiapponi C, Crozier I, de Swart RL, Dietzgen RG, Dolnik O, Drexler JF, Dürrwald R, et al. (2019) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch. Virol.* **164:** 1967-1980

Anderson L, Henderson C & Adachi Y (2001) Phosphorylation and Rapid Relocalization of 53BP1 to Nuclear Foci upon DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **21:** 1719-1729 Available at: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.5.1719-1729.2001

André C, Dinel AL, Ferreira G, Layé S & Castanon N (2014) Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: Focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. *Brain. Behav. Immun.* **41:** 10-21

André C, O'Connor JC, Kelley KW, Lestage J, Dantzer R & Castanon N (2008) Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide

administration. *J. Neuroimmunol.* **200:** 90-99

Antonucci F, Corradini I, Fossati G, Tomasoni R, Menna E & Matteoli M (2016) SNAP-25, a Known presynaptic protein with emerging postsynaptic functions. *Front. Synaptic Neurosci.* **8:** 1-9

Antunes M & Biala G (2012) The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* **13:** 93-110

Arents G & Moudrianakis EN (1993) Topography of the histone octamer surface: Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA (histone fold/helix-strand-helix motif/parallel fi bridge/binary DNA binding sites/nucleosome)

Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Takeda PY, Anthony DC, Malva JO & Crespo-Lopez ME (2019) What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells* **8:**

_____B_____

Babu A & Verma RS (1987) Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* **108:**

Bajramovic JJ, Münter S, Syan S, Nehrbass U, Brahic M & Gonzalez-Dunia D (2003) Borna Disease Virus Glycoprotein Is Required for Viral Dissemination in Neurons. *J. Virol.* **77:** 12222-12231

Balschun D, Randolf A, Pitossi F, Schneider H, Del Rey A & Besedovsky HO (2003) Hippocampal interleukin-1β gene expression during long-term potentiation decays with age. In *Annals of the New York Academy of Sciences* p 1-8.

Banks WA, Kastin AJ & Broadwell RD (1995) Passage of Cytokines across the Blood-Brain Barrier. *Neuroimmunomodulation* **2:** 241-248

Bannister AJ & Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21:** 381-395

Barnig C, Bezema T, Calder PC, Charloux A, Frossard N, Garssen J, Haworth O, Dilevskaya K, Levi-Schaffer F, Lonsdorfer E, Wauben M, Kraneveld AD & Te Velde AA (2019) Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* **10:** 1699

Bassi MS, Iezzi E, Gilio L, Centonze D & Buttari F (2019) Synaptic plasticity shapes brain connectivity: Implications for network topology. *Int. J. Mol. Sci.* **20:**

Belarbi K, Tweedie D, Arellano C, Jopson T, Greig N & Rosi S (2011) P3-418: Inhibition of TNF-alpha protein synthesis restores neuronal function and reverses cognitive deficits

induced by chronic neuroinflammation. *Alzheimer's Dement.* **7:** S649-S649 Available at: http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/23

Di Benedetto S, Müller L, Wenger E, Düzel S & Pawelec G (2017) Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **75:** 114-128

Berson A, Nativio R, Berger SL & Bonini NM (2018) Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* **41:** 587-598 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2018.05.005

Besedovsky L, Lange T & Born J (2012) Sleep and immune function. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **463:** 121-137

Bétourné A, Szelechowski M, Thouard A, Abrial E, Jean A, Zaidi F, Foret C, Bonnaud EM, Charlier CM, Suberbielle E, Malnou CE, Granon S, Rampon C & Gonzalez-Dunia D (2018) Hippocampal expression of a virus-derived protein impairs memory in mice. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **115:** 1611-1616

Bettiol A, Lopalco G, Emmi G, Cantarini L, Urban ML, Vitale A, Denora N, Lopalco A, Cutrignelli A, Lopedota A, Venerito V, Fornaro M, Vannacci A, Rigante D, Cimaz R & Iannone F (2019) Unveiling the efficacy, safety, and tolerability of anti-interleukin-1 treatment in monogenic and multifactorial autoinflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20:**

Billaud J-N, Ly C, Phillips TR & de la Torre JC (2000) Borna Disease Virus Persistence Causes Inhibition of Glutamate Uptake by Feline Primary Cortical Astrocytes. *J. Virol.* **74:** 10438-10446 Available at: http://jvi.asm.org/

Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321:** 1-5

Bird CM & Burgess N (2008) The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* **9:** 182-194

Blum-Degena D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H & Riederer P (1995) Interleukin-1β and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* **202:** 17-20

Boche D, Perry VH & Nicoll JAR (2013) Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39:** 3-18

Boku S, Nakagawa S, Toda H & Hishimoto A (2018) Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Comput. Graph. Forum* **37:** 3-12

Bonnaud EM, Szelechowski M, Bétourné A, Foret C, Thouard A, Gonzalez-Dunia D & Malnou CE (2015) Borna Disease Virus Phosphoprotein Modulates Epigenetic Signaling in

Neurons To Control Viral Replication. *J. Virol.* **89:** 5996-6008 Available at: http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00454-15

Bourgognon J-M & Cavanagh J (2020) The role of cytokines in modulating learning and memory and brain plasticity. *Brain Neurosci. Adv.* **4:** 239821282097980

Briese T, De la Torre JC, Lewis A, Ludwig H & Lipkin WI (1992) Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **89:** 11486-11489

Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park YS, Kim S, Ludwig H & Lipkin WI (1994) Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **91:** 4362-4366

Buck-Koehntop BA & Defossez PA (2013) On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics* **8:** 131-137

Burgold T, Spreafico F, De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Natoli G & Testa G (2008) The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PLoS One* **3:**

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A & Chen DJ (2001) ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *J. Biol. Chem.* **276:** 42462-42467 Available at: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.C100466200

Bush NG, Evans-Roberts K & Maxwell A (2015) DNA topoisomerases. *EcoSal Plus* Available at: http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.4.4.9

Bustos FJ, Ampuero E, Jury N, Aguilar R, Falahi F, Toledo J, Ahumada J, Lata J, Cubillos P, Henríquez B, Guerra M V., Stehberg J, Neve RL, Inestrosa NC, Wyneken U, Fuenzalida M, Härtel S, Sena-Esteves M, Varela-Nallar L, Rots MG, et al. (2017) Epigenetic editing of the Dlg4/PSD95 gene improves cognition in aged and Alzheimer's disease mice. *Brain* **140:** 3252-3268

_____C_____

Carbone KM, Rubin SA, Sierra-Honigmann AM & Lederman HM (1993) Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J. Virol.* **67:** 1453-1460 Available at: http://jvi.asm.org/

Caron P, van der Linden J & van Attikum H (2019a) Bon voyage: A transcriptional journey around DNA breaks. *DNA Repair (Amst).* **82:**

Caron P, Pankotai T, Wiegant WW, Tollenaere MAX, Furst A, Bonhomme C, Helfricht A, de Groot A, Pastink A, Vertegaal ACO, Luijsterburg MS, Soutoglou E & van Attikum H

(2019b) WWP2 ubiquitylates RNA polymerase II for DNA-PK-dependent transcription arrest and repair at DNA breaks. *Genes Dev.* **33:** 684-704

Casanova A, Bettamin L, Blatche MC, Mathieu F, Martin H, Gonzalez-Dunia D, Nicu L & Larrieu G (2018) Nanowire based bioprobes for electrical monitoring of electrogenic cells. *J. Phys. Condens. Matter* **30:**

Catez F & Hock R (2010) Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: Lessons from live cell imaging. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799:** 15-27 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagrm.2009.11.001

Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM & Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* **5:** 675-679

Celeste A, Peterson S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Tang Chen H, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, et al. (2002) Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science (80-.).* **296:** 922-927 Available at: www.sciencemag.org/

Chakraborty U, Dinh TA & Alani E (2018) Genomic instability promoted by overexpression of mismatch repair factors in yeast: A model for understanding cancer progression. *Genetics* **209:** 439-456

Charlier CM, Debaisieux S, Foret C, Thouard A, Schiavo G, Gonzalez-Dunia D & Malnou CE (2016) Neuronal retrograde transport of Borna disease virus occurs in signalling endosomes. *J. Gen. Virol.* **97:** 3215-3224

Charlier CM, Wu Y-J, Allart S, Malnou CE, Schwemmle M & Gonzalez-Dunia D (2013) Analysis of Borna Disease Virus Trafficking in Live Infected Cells by Using a Virus Encoding a Tetracysteine-Tagged P Protein. *J. Virol.* **87:** 12339-12348 Available at: http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01127-13

Charman M & Weitzman MD (2020) Replication compartments of DNA viruses in the nucleus: Location, location, location. *Viruses* **12:**

Chase G, Mayer D, Hildebrand A, Frank R, Hayashi Y, Tomonaga K & Schwemmle M (2007) Borna Disease Virus Matrix Protein Is an Integral Component of the Viral Ribonucleoprotein Complex That Does Not Interfere with Polymerase Activity. *J. Virol.* **81:** 743-749

Chatterjee N & Walker GC (2017) Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* Available at: http://dx.doi.org/10.1002/em.20575

Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q & Cheng Y (2018) Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* **9:**

Chevalier G, Suberbielle E, Monnet C, Duplan V, Martin-Blondel G, Farrugia F, Le Masson G, Liblau R & Gonzalez-Dunia D (2011) Neurons are MHC class i-Dependent Targets for CD8 t cells upon neurotropic viral infection. *PLoS Pathog.* **7:**

Chin EWM & Goh ELK (2019) MeCP2 dysfunction in rett syndrome and neuropsychiatric disorders. In *Methods in Molecular Biology* p 573-591. Humana Press Inc.

Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A & Sweatt JD (2007) The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J. Neurosci.* **27:** 12732-12742

Citri A & Malenka RC (2008) Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33:** 18-41

Clemente R & de la Torre JC (2007) Cell-to-Cell Spread of Borna Disease Virus Proceeds in the Absence of the Virus Primary Receptor and Furin-Mediated Processing of the Virus Surface Glycoprotein. *J. Virol.* **81:** 5968-5977

Clemente R & de la Torre JC (2009) Cell Entry of Borna Disease Virus Follows a Clathrin-Mediated Endocytosis Pathway That Requires Rab5 and Microtubules. *J. Virol.* **83:** 10406-10416

Clemente R, Sisman E, Aza-Blanc P & de la Torre JC (2010) Identification of Host Factors Involved in Borna Disease Virus Cell Entry through a Small Interfering RNA Functional Genetic Screen. *J. Virol.* **84:** 3562-3575

Cope EC & Gould E (2019) Adult Neurogenesis, Glia, and the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell* **24:** 690-705

Crowe SL, Movsesyan VA, Jorgensen TJ & Kondratyev A (2006) Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* **23:** 2351-2361

Cubitt B & de la Torre JC (1994) Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J. Virol.* **68:** 1371-1381 Available at: http://jvi.asm.org/

Cubitt B, Oldstone C & de la Torre JC (1994) Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* **68:** 1382-1396 Available at: http://jvi.asm.org/

Cunningham C, Campion S, Teeling J, Felton L & Perry VH (2007) The sickness behaviour

and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain. Behav. Immun.* **21:** 490-502

Czerniawski J & Guzowski JF (2014) Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *J. Neurosci.* **34:** 12470-12480

_____D_____

Daley JM & Sung P (2014) 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* **34:** 1380-1388

Daneman R & Prat A (2015) The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7:**

Dantzer R (2001) Cytokine-induced sickness behavior: Where do we stand? *Brain. Behav. Immun.* **15:** 7-24

Dantzer R (2009) Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **29:** 247-264

Denninger JK, Smith BM & Kirby ED (2018) Novel object recognition and object location behavioral testing in mice on a budget. *J. Vis. Exp.* **2018:**

Deschl U, Stitz L, Herzog S, Frese K & Rott R (1990) Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol.* **81:** 41-50

Deuschl G, Beghi E, Fazekas F, Varga T, Christoforidi KA, Sipido E, Bassetti CL, Vos T & Feigin VL (2020) The burden of neurological diseases in Europe: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Heal.* **5:** e551-e567

Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* **117:** 3720-3732

Dinarello CA (2018) Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **281:** 8-27

Ding HH, Zhang SB, Lv YY, Ma C, Liu M, Zhang KB, Ruan XC, Wei JY, Xin WJ & Wu SL (2019) TNF-α/STAT3 pathway epigenetically upregulates Nav1.6 expression in DRG and contributes to neuropathic pain induced by L5-VRT. *J. Neuroinflammation* **16:**

DiSabato DJ, Nemeth DP, Liu X, Witcher KG, O'Neil SM, Oliver B, Bray CE, Sheridan JF, Godbout JP & Quan N (2020) Interleukin-1 receptor on hippocampal neurons drives social withdrawal and cognitive deficits after chronic social stress. *Mol. Psychiatry*

DiSabato DJ, Quan N & Godbout JP (2016) Neuroinflammation: the devil is in the details. *J. Neurochem.* **139:** 136-153

Dokalis N & Prinz M (2019) Resolution of neuroinflammation: mechanisms and potential therapeutic option. *Semin. Immunopathol.* **41:** 699-709

Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jønsson KL, Jakobsen MR, Nevels MM, Bowie AG & Unterholzner L (2018) Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol. Cell* **71:** 745-760.e5

Dürrwald R, Kolodziejek J, Herzog S & Nowotny N (2007) Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev. Med. Virol.* **17:** 181-203

Dürrwald R, Kolodziejek J, Muluneh A, Herzog S & Nowotny N (2006) Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect.* **8:** 917-929

Dürrwald R & Ludwig H (1997) Borna Disease Virus (BDV), a (Zoonotic?) Worldwide Pathogen. A review of the History of the Disease and the Virus Infection with Comprehensive Bibliography. *J. Vet. Med. Ser. B* **44:** 147-184

Van Dyken P & Lacoste B (2018) Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Front. Neurosci.* **12:**

_____E_____

Eichenbaum H (2017) Time (and space) in the hippocampus. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **17:** 65-70

Elander L, Engström L, Hallbeck M & Blomqvist A (2007) IL-1β and LPS induce anorexia by distinct mechanisms differentially dependent on microsomal prostaglandin E synthase-1. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292:** 258-267 Available at: www.ajpregu.org

Erdmann G, Schütz G & Berger S (2007) Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci.* **8:** 1-10

_____F_____

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St G, Iii L, Kenny PJ & Wahlestedt C (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of b-secretase. *Nat. Med.* **14:** 1-8 Available at: http://www.nature.com/naturemedicine

Farina C, Aloisi F & Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.

Trends Immunol. **28:** 138-145

Farrar WL, Kilian PL, Ruff MR, Hill JM & Pert CB (1987) Visualization and characterization of interleukin 1 receptors in brain. W. *J. Immunol.* **139:** 459-463 Available at: http://www.jimmunol.org/content/139/2/459

Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM & Pitossi FJ (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1β in the substantia nigra. *Neurobiol. Dis.* **24:** 183-193

Fields JK, Günther S & Sundberg EJ (2019) Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Front. Immunol.* **10:** 1-20

Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M & Tsai LH (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447:** 178-182

Flint J, Racaniello VR, Rall GF & Skalka AM (2015) Mechanisms of Pathogenesis. In *Principles of Virology* p 134-173.

Fogal B & Hewett SJ (2008) Interleukin-1β: A bridge between inflammation and excitotoxicity? *J. Neurochem.* **106:** 1-23

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102:** 10604-10609 Available at: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0500398102

Frenois F, Moreau M, O'Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R & Castanon N (2007) Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* **32:** 516-531

Frías-Lasserre D & Villagra CA (2017) The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. *Front. Microbiol.* **8:**

Friedman WJ (2001) Cytokines regulate expression of the type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Exp. Neurol.* **168:** 23-31

_____G_____

García-Sastre A & Biron CA (2006) Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in détente. *Science (80-.).* **312:** 879-882 Available at: http://science.sciencemag.org/

Gardoni F, Boraso M, Zianni E, Corsini E, Galli CL, Cattabeni F, Marinovich M, Di Luca M & Viviani B (2011) Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic

membrane driven by interleukin-1β and NMDA stimulation. *J. Neuroinflammation* **8:**

Gibney ER & Nolan CM (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb).* **105:** 4-13

Goldberg AD, Allis CD & Bernstein E (2007) Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* **128:** 635-638

Gonzalez-Dunia D, Cubitt B & de la Torre JC (1998) Mechanism of Borna Disease Virus Entry into Cells. *J. Virol.* **72:** 783-788 Available at: http://jvi.asm.org/

Gonzalez-Dunia D, Sauder C & De la Torre JC (1997) Borna disease virus and the brain. *Brain Res. Bull.* **44:** 647-664

Gonzalez-Dunia D, Volmer R, Mayer D & Schwemmle M (2005) Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res.* **111:** 224-234

Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T & Yirmiya R (2008) Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry* **13:** 717-728

Goshen I, Kreisel T, Ounallah-Saad H, Renbaum P, Zalzstein Y, Ben-Hur T, Levy-Lahad E & Yirmiya R (2007) A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* **32:** 1106-1115

Gosselin D, Bellavance MA & Rivest S (2013) IL-1RAcPb signaling regulates adaptive mechanisms in neurons that promote their long-term survival following excitotoxic insults. *Front. Cell. Neurosci.*

Gräff J & Mansuy IM (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* **192:** 70-87

Griñán-Ferré C, Sarroca S, Ivanova A, Puigoriol-Illamola D, Aguado F, Camins A, Sanfeliu C & Pallàs M (2016) Epigenetic mechanisms underlying cognitive impairment and Alzheimer disease hallmarks in 5XFAD mice. *Aging (Albany. NY).* **8:** 664-684

Gu Y & Huganir RL (2016) Identification of the SNARE complex mediating the exocytosis of NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113:** 12280-12285

Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJF, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R & Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **459:** 55-60

_____H_____

Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A & Weber F (2008) Processing of

genome 5′ termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One* **3:**

Hagiwara K, Momiyama N, Taniyama H, Nakaya T, Tsunoda N, Ishihara C & Ikuta K (1997) Demonstration of Borna disease virus (BDV) in specific regions of the brain from horses positive for serum antibodies to BDV but negative for BDV RNA in the blood and internal organs. *Med. Microbiol. Immunol.* **186:** 19-24

Hailer NP, Vogt C, Korf H & Dehghani F (2005) Interleukin-1 b exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. **21:** 2347-2360

Hallensleben W, Schwemmle M, Hausmann J, Stitz L, Volk B, Pagenstecher A & Staeheli P (1998) Borna Disease Virus-Induced Neurological Disorder in Mice: Infection of Neonates Results in Immunopathology. *J. Virol.* **72:** 4379-4386 Available at: http://jvi.asm.org/

Hammack C, Ogden SC, Madden JC, Medina A, Xu C, Phillips E, Son Y, Cone A, Giovinazzi S, Didier RA, Gilbert DM, Song H, Ming G, Wen Z, Brinton MA, Gunjan A & Tang H (2019) Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. *J. Virol.* **93:**

Hans A, Bajramovic JJ, Syan S, Perret E, Dunia I, Brahic M & Gonzalez-Dunia D (2004) Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. *FASEB J.* **18:** 863-865

Hardingham GE & Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **11:** 682-696

Haroon E, Raison CL & Miller AH (2012) Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* **37:** 137-162

Hart BL (1988) Biological Basis of the Behavior of Sick Animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **12:** 123-137

Hausmann J, Hallensleben W, de la Torre JC, Pagenstecher A, Zimmermann C, Pircher H & Staeheli P (1999) T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **96:** 9769-9774 Available at: www.pnas.org.

Herden C, Briese T, Lipkin WI & Richt JA (2013) Bornaviridae. In *Fields Virology - Volume 1* p 1124-1150.

Herzog S, Frese K & Rott R (1991) Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J. Gen. Virol.* **72:** 535-540

Herzog S & Rott R (1980) Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med. Microbiol. Immunol.* **168:** 153-158

Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T & Tomonaga K (2016) Borna disease virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **291:** 25789-25798

Hoenen T, Shabman RS, Groseth A, Herwig A, Weber M, Schudt G, Dolnik O, Basler CF, Becker S & Feldmann H (2012) Inclusion Bodies Are a Site of Ebolavirus Replication. *J. Virol.* **86:** 11779-11788

Hoffmann B, Tappe D, Höper D, Herden C, Boldt A, Mawrin C, Niederstraßer O, Müller T, Jenckel M, Van Der Grinten E, Lutter C, Abendroth B, Teifke JP, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Ulrich RG & Beer M (2015) A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N. Engl. J. Med.* **373:** 154-162

Honda T & Tomonaga K (2013) Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in Borna disease virus infection. *Viruses* **5:** 1978-1990

Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Williams BL, Quan PL, Hornig M, Street C, Palacios G, Hutchison SK, Franca M, Egholm M, Briese T & Lipkin WI (2008) Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg. Infect. Dis.* **14:** 1883-1886

Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM & Tomonaga K (2010) Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* **463:** 84-7 Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nature08695

Hornig M, Solbrig M, Horscroft N, Weissenböck H & Lipkin WI (2001) Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: Models for neuropsychiatric disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **253:** 157-177

Hornig M, Weissenböck H, Horscroft N & Lipkin WI (1999) An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **96:** 12102-12107 Available at: www.pnas.org

Hosseini S, Wilk E, Michaelsen-Preusse K, Gerhauser I, Baumgärtner W, Geffers R, Schughart K & Korte M (2018) Long-term neuroinflammation induced by influenza a virus infection and the impact on hippocampal neuron morphology and function. *J. Neurosci.* **38:** 3060-3080

Hu HL, Shiflett LA, Kobayashi M, Chao M V., Wilson AC, Mohr I & Huang TT (2019)

TOP2β-Dependent Nuclear DNA Damage Shapes Extracellular Growth Factor Responses via Dynamic AKT Phosphorylation to Control Virus Latency. *Mol. Cell* **74:** 466-480.e4

Huang Y, Smith DE, Ibáñez-Sandoval O, Sims JE & Friedman WJ (2011) Neuron-specific effects of interleukin-1β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J. Neurosci.* **31:** 18048-18059

Hueston CM, O'Leary JD, Hoban AE, Kozareva DA, Pawley LC, O'Leary OF, Cryan JF & Nolan YM (2018) Chronic interleukin-1β in the dorsal hippocampus impairs behavioural pattern separation. *Brain. Behav. Immun.* **74:** 252-264

_____I_____

Imeri L & Opp MR (2009) How (and why) the immune system makes us sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* **10:** 199-210

Italiani P, Puxeddu I, Napoletano S, Scala E, Melillo D, Manocchio S, Angiolillo A, Migliorini P, Boraschi D, Vitale E & Di Costanzo A (2018) Circulating levels of IL-1 family cytokines and receptors in Alzheimer's disease: New markers of disease progression? *J. Neuroinflammation* **15:**

Iyama T & Wilson DM (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst).* **12:** 620-636

_____J_____

Jie J, Xu X, Xia J, Tu Z, Guo Y, Li C, Zhang X, Wang H, Song W & Xie P (2018) Memory Impairment Induced by Borna Disease Virus 1 Infection is Associated with Reduced H3K9 Acetylation. *Cell. Physiol. Biochem.* **49:** 381-394

Ju B-G, Lunyak V V., Perissi V, Garcia-Bassets Y, Rose DW, Glass CK & Rosenfeld MG (2006) A Topoisomerase IIß-Mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription. *Science (80-.).* **312:** 1798-1802

Jurgens HA, Amancherla K & Johnson RW (2012) Influenza Infection Induces Neuroinflammation, Alters Hippocampal Neuron Morphology, and Impairs Cognition in Adult Mice. *J. Neurosci.* **32:** 3958-3968

_____K_____

Kamakaka RT & Biggins S (2005) Histone variants: Deviants? *Genes Dev.* **19:** 295-310

Kamitani W, Shoya Y, Kobayashi T, Watanabe M, Lee B-J, Zhang G, Tomonaga K & Ikuta K (2001) Borna Disease Virus Phosphoprotein Binds a Neurite Outgrowth Factor, Amphoterin/HMG-1. *J. Virol.* **75:** 8742-8751

Kanungo J (2016) DNA-PK Deficiency in Alzheimer's Disease. *J Neurol. Neuromedecine* **1:** Available at: www.jneurology.com

Kao M, Ludwig H & Gosztonyi G (1984) Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J. Gen. Virol.* **65:** 1845-1849

Kistler AL, Gancz A, Clubb S, Skewes-Cox P, Fischer K, Sorber K, Chiu CY, Lublin A, Mechani S, Farnoushi Y, Greninger A, Wen CC, Karlene SB, Ganem D & DeRisi JL (2008) Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: Identification of a candidate etiologic agent. *Virol. J.* **5:**

Klein RS, Garber C, Funk KE, Salimi H, Soung A, Kanmogne M, Manivasagam S, Agner S & Cain M (2019) Neuroinflammation During RNA Viral Infections. *Annu. Rev. Immunol.* **37:** 73-95 Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-

Kobayashi T, Kamitani W, Zhang G, Watanabe M, Tomonaga K & Ikuta K (2001) Borna Disease Virus Nucleoprotein Requires both Nuclear Localization and Export Activities for Viral Nucleocytoplasmic Shuttling. *J. Virol.* **75:** 3404-3412

Kohno T, Goto T, Takasaki T, Morita C, Nakaya T, Ikuta K, Kurane I, Sano K & Nakai M (1999) Fine Structure and Morphogenesis of Borna Disease Virus. *J. Virol.* **73:** 760-766 Available at: http://jvi.asm.org/

Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, Takai M, Ono Y, Taniguchi Y & Hara K (1995) In vivo administration of IL-1β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J. Oral Pathol. Med.* **24:** 420-434

Kojima S, Sato R, Yanai M, Komatsu Y, Horie M, Igarashi M & Tomonaga K (2018) Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. *J. Virol.* **93:** Available at: https://doi.org/10.1128/JVI

Kong X, Gong Z, Zhang L, Sun X, Ou Z, Xu B, Huang J, Long D, He X, Lin X, Li Q, Xu L & Xuan A (2019) JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation. *Brain. Behav. Immun.* **79:** 159-173

Korn K, Coras R, Bobinger T, Herzog SM, Lücking H, Stöhr R, Huttner HB, Hartmann A & Ensser A (2018) Fatal Encephalitis Associated with Borna Disease Virus 1. *N. Engl. J. Med.* **379:** 1375-1377

Krasnow SM, Knoll JG, Verghese SC, Levasseur PR & Marks DL (2017) Amplification and propagation of interleukin-1β signaling by murine brain endothelial and glial cells. *J. Neuroinflammation* **14:**

Kraus C, Castrén E, Kasper S & Lanzenberger R (2017) Serotonin and neuroplasticity – Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. *Neurosci.*

Biobehav. Rev. **77:** 317-326

_____L_____

de la Torre JC (1994) Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* **68:** 7669-7675 Available at: http://jvi.asm.org/

Labrousse VF, Costes L, Aubert A, Darnaudéry M, Ferreira G, Amédée T & Layé S (2009) Impaired interleukin-1β and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X7 receptor-deficient mice. *PLoS One* **4:**

Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Grégoire S, Bretillon L & Layé S (2012) Short-term long chain Omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS One* **7:**

Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y & Blondel D (2009) Functional Characterization of Negri Bodies (NBs) in Rabies Virus-Infected Cells: Evidence that NBs Are Sites of Viral Transcription and Replication. *J. Virol.* **83:** 7948-7958

Lawson LJ, Perry VH & Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48:** 405-415

Layé S, Gheusi G, Cremona S, Combe C, Kelley K, Dantzer R & Parnet P (2000) Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279:** 93-98 Available at: http://www.ajpregu.org

Laye S, Parnet P, Goujon E & Dantzer R (1994) Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Mol. Brain Res.* **27:** 157-162

Lee JT (2011) Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12:** 815-826

Lesné S, Ming TK, Kotilinek L, Kayed R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M & Ashe KH (2006) A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440:** 352-357

Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL & Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* **279:** 40545-40559

Levenson JM & Sweatt JD (2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* **6:** 108-118

Li Y, Liu L, Barger SW & Griffin WST (2003) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J. Neurosci.* **23:** 1605-1611

Li Y, Song W, Wu J, Zhang Q, He J, Li A, Qian J, Zhai A, Hu Y, Kao W, Wei L, Zhang F & Xu D (2013) MAVS-mediated host cell defense is inhibited by Borna disease virus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45:** 1546-1555

Lipkin WI, Briese T & Hornig M (2011) Borna disease virus - Fact and fantasy. *Virus Res.* **162:** 162-172

Lipkin WI, Travis GH, Carbone KM & Wilson MC (1990) Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **87:** 4184-4188

Lippuner K, Del Pozo E, MacKenzie A & Jaeger P (1999) Long-term systemic administration of human recombinant interleukin-1β induces a dose-dependent fall in circulating parathyroid hormone in rats. *Horm. Res.* **51:** 74-77

Liu X, Nemeth DP, McKim DB, Zhu L, DiSabato DJ, Berdysz O, Gorantla G, Oliver B, Witcher KG, Wang Y, Negray CE, Vegesna RS, Sheridan JF, Godbout JP, Robson MJ, Blakely RD, Popovich PG, Bilbo SD & Quan N (2019) Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity* **50:** 317-333.e6

Liyanage VRB & Rastegar M (2014) Rett syndrome and MeCP2. *NeuroMolecular Med.* **16:** 231-264

Louveau A, Harris TH & Kipnis J (2015) Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.* **36:** 569-577 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006

Lubin FD, Roth TL & Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of bdnf gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci.* **28:** 10576-10586

Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C, Griffin DE, Brindle HE, Solomon T, Brown AS, van Riel D, Wolthers KC, Pajkrt D, Wohlsein P, Martina BEE, Baumgärtner W, Verjans GM & Osterhaus ADME (2016) Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* **131:** 159-184

Luftig MA (2014) Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. *Annu. Rev. Virol.* **1:** 605-625

Lynch MA (2004) Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* **84:** 87-136 Available at: www.prv.org

_____M_____

Madabhushi R, Gao F, Pfenning AR, Pan L, Yamakawa S, Seo J, Rueda R, Phan TX, Yamakawa H, Pao PC, Stott RT, Gjoneska E, Nott A, Cho S, Kellis M & Tsai LH (2015)

Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell* **161:** 1592-1605

Madabhushi R, Pan L & Tsai LH (2014) DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* **83:** 266-282 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034

Maeshima K, Imai R, Tamura S & Nozaki T (2014) Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma* **123:** 225-237

Malgaroli A, Ting AE, Wendland B, Bergamaschi A, Villa A, Tsien RW & Scheller RH (1995) Presynaptic Component of Long-Term Potentiation Visualized at Individual Hippocampal Synapses. *Science (80-.).* **268:** 1624-1628

Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD & Matsushima GK (2001) Interleukin-1β promotes repair of the CNS. *J. Neurosci.* **21:** 7046-7052

Matsumoto N, Kitanishi T & Mizuseki K (2019) The subiculum: Unique hippocampal hub and more. *Neurosci. Res.* **143:** 1-12

Matsumoto Y, Hayashi Y, Omori H, Honda T, Daito T, Horie M, Ikuta K, Fujino K, Nakamura S, Schneider U, Chase G, Yoshimori T, Schwemmle M & Tomonaga K (2012) Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* **11:** 492-503

Mayer D, Baginsky S & Schwemmle M (2005) Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics* **5:** 4483-4487

Mazumder TH, Nath S, Nath N & Kumar M (2014) Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Prognosis using molecular approach. *Cent. Eur. J. Biol.* **9:** 593-613

McFarland HF & Martin R (2007) Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* **8:** 913-919

Mehta A & Haber JE (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6:**

Miller CA & Sweatt JD (2007) Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* **53:** 857-869

Miller KM, Tjeertes J V., Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S & Jackson SP (2010) Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17:** 1144-1151

Minter MR, Taylor JM & Crack PJ (2016) The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **136:** 457-474

Monif M, Reid CA, Powell KL, Drummond KJ, O'Brien TJ & Williams DA (2016) Interleukin-

1β has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore. *J. Neuroinflammation* **13:**

Moore AH, Wu M, Shaftel SS, Graham KA & O'Banion MK (2009) Sustained expression of interleukin-1β in mouse hippocampus impairs spatial memory. *Neuroscience* **164:** 1484-1495

Moore LD, Le T & Fan G (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38:** 23-38

Morales JA, Herzog S, Kompter C, Frese K & Rott R (1988) Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* **177:** 51-68

Moreau M, André C, O'Connor JC, Dumich SA, Woods JA, Kelley KW, Dantzer R, Lestage J & Castanon N (2008) Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain. Behav. Immun.* **22:** 1087-1095

Morlando M & Fatica A (2018) Alteration of epigenetic regulation by long noncoding RNAs in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19:**

Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M & Wang P (2021) Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis* **26:** 152-162

Murray KN, Parry-Jones AR & Allan SM (2015) Interleukin-1 and acute brain injury. *Front. Cell. Neurosci.* **9:** 1-17

_____N_____

Na KS, Jung HY & Kim YK (2014) The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **48:** 277-286

Nakagawa Y & Chiba K (2015) Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* **154:** 21-35

Nan X, Ng H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN & Bird A (1998) Transcriptional repressionby themethyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393:** 386-389

Nevers Q, Albertini AA, Lagaudrière-Gesbert C & Gaudin Y (2020) Negri bodies and other virus membrane-less replication compartments. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1867:**

Nikolic J, Le Bars R, Lama Z, Scrima N, Lagaudrière-Gesbert C, Gaudin Y & Blondel D (2017)

Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat. Commun.* **8:**

Niller HH, Angstwurm K, Rubbenstroth D, Schlottau K, Ebinger A, Giese S, Wunderlich S, Banas B, Forth LF, Hoffmann D, Höper D, Schwemmle M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Nobach D, Herden C, Brochhausen C, Velez-Char N, Mamilos A, Utpatel K, et al. (2020) Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999–2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* **20:** 467-477

Nimmerjahn A, Kirchhoff F & Helmchen F (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo Axel. *Science (80-.).* **308:** 1314-1318

_____O_____

O'Connor JC, Lawson MA, André C, Briley EM, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Herkenham M, Dantzer R & Kelley KW (2009) Induction of IDO by Bacille Calmette-Guérin Is Responsible for Development of Murine Depressive-Like Behavior. *J. Immunol.* **182:** 3202-3212

O'Leary TP & Brown RE (2012) The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *J. Neurosci. Methods* **203:** 315-324

Olins AL & Olins DE (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science (80-.).* **183:** 330-332

Olivares D, K. Deshpande V, Shi Y, K. Lahiri D, H. Greig N, T. Rogers J & Huang X (2013) N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* **9:** 746-758 Available at: http://www.molgen.ua.ac.be/

Oudet P (1975) and Biochemical that Chromatin Structure Is a Repeating Unit ". *Cell* **4:** 281-300

Ovanesov M V., Ayhan Y, Wolbert C, Moldovan K, Sauder C & Pletnikov M V. (2008) Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J. Neuroinflammation* **5:**

Ovanesov M V., Sauder C, Rubin SA, Richt J, Nath A, Carbone KM & Pletnikov M V. (2006) Activation of Microglia by Borna Disease Virus Infection: In Vitro Study. *J. Virol.* **80:** 12141-12148

_____P_____

Panier S & Boulton SJ (2014) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15:** 7-18 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24326623

Pao PC, Penney J & Tsai LH (2019) Examining the role of HDACs in DNA double-strand break repair in neurons. In *Methods in Molecular Biology* p 225-234. Humana Press Inc.

Paolicelli RC, Bisht K & Tremblay MÈ (2014) Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front. Cell. Neurosci.* **8:**

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR & Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155:** 1596-1609

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M & Bonner WM (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10:** 886-895

Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z & Lou Z (2011) MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* **470:** 124-129

Penas C & Navarro X (2018) Epigenetic modifications associated to neuroinflammation and neuropathic pain after neural trauma. *Front. Cell. Neurosci.* **12:**

Peng G, Yan Y, Zhu C, Wang S, Yan X, Lu L, Li W, Hu J, Wei W, Mu Y, Chen Y, Feng Y, Gong R, Wu K, Zhang F, Zhang X, Zhu Y & Wu J (2008) Borna Disease Virus P Protein Affects Neural Transmission through Interactions with Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein. *J. Virol.* **82:** 12487-12497

Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **15:** 250-263

Perez M & de la Torre JC (2005) Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *J. Gen. Virol.* **86:** 1891-1895

Perez M, Sanchez A, Cubitt B, Rosario D & de la Torre JC (2003) A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* **84:** 3099-3104 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14573815

Pfeiffer P, Goedecke W & Obe G (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15:** 289-302

Pinteaux E, Abdulaal WH, Mufazalov IA, Humphreys NE, Simonsen-Jackson M, Francis S,

Müller W & Waisman A (2020) Cell-specific conditional deletion of interleukin-1 (IL-1) ligands and its receptors: a new toolbox to study the role of IL-1 in health and disease. *J. Mol. Med.* **98:** 923-930 Available at: https://doi.org/10.1007/s00109-020-01928-5

Planz O, Pleschka S & Ludwig S (2001) MEK-Specific Inhibitor U0126 Blocks Spread of Borna Disease Virus in Cultured Cells. *J. Virol.* **75:** 4871-4877

Poenisch M, Burger N, Staeheli P, Bauer G & Schneider U (2009) Protein X of Borna Disease Virus Inhibits Apoptosis and Promotes Viral Persistence in the Central Nervous Systems of Newborn-Infected Rats. *J. Virol.* **83:** 4297-4307

Poenisch M, Unterstab G, Wolff T, Staeheli P & Schneider U (2004) The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J. Gen. Virol.* **85:** 1895-1898

Polo SE (2017) Switching genes to silent mode near DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.* **18:** 659-660

Poon CH, Chan YS, Fung ML & Lim LW (2020) Memory and neuromodulation: A perspective of DNA methylation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **111:** 57-68

Popp HD, Brendel S, Hofmann WK & Fabarius A (2017) Immunofluorescence microscopy of γH2AX and 53BP1 for analyzing the formation and repair of DNA double-strand breaks. *J. Vis. Exp.* **2017:**

Prat CMA, Schmid S, Farrugia F, Cenac N, Le Masson G, Schwemmle M & Gonzalez-Dunia D (2009) Mutation of the protein kinase C site in Borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS Pathog.* **5:**

Prieto GA, Snigdha S, Baglietto-Vargas D, Smith ED, Berchtold NC, Tong L, Ajami D, Laferla FM, Rebek J & Cotman CW (2015) Synapse-specific IL-1 receptor subunit reconfiguration augments vulnerability to IL-1β in the aged hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112:** E5078-E5087

Pringle CR (1996) Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. In *Archives of virology* p 2251-2256.

Puopolo M, Raviola E & Bean BP (2007) Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **27:** 645-656

Puorger ME, Hilbe M, Müller JP, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K & Ehrensperger F (2010) Distribution of borna disease virus antigen and rna in tissues of naturally infected

bicolored white-toothed shrews, crocidura leucodon, supporting their role as reservoir host species. *Vet. Pathol.* **47:** 236-244

_____Q_____

Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP & Cheng Y (2016) Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol.* **73:** 1316-1324

Quina AS, Buschbeck M & Di Croce L (2006) Chromatin structure and epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* **72:** 1563-1569

_____R_____

Rachdaoui N, Li L, Willard B, Kasumov T, Previs S & Sarkar D (2017) Turnover of histones and histone variants in postnatal rat brain: Effects of alcohol exposure. *Clin. Epigenetics* **9:** 1-18

Renaud J, Thérien HM, Plouffe M & Martinoli MG (2015) La neuro-inflammation : Dr Jekyll or Mr Hyde? *Medecine/Sciences* **31:** 979-988

Réu P, Khosravi A, Bernard S, Mold JE, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H & Frisén J (2017) The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* **20:** 779-784

Richt JA, Grabner A & Herzog S (2000) Borna disease in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **16:**

Del Rio D, Morales L, Ruiz-Gayo M & Del Olmo N (2016) Effect of high-fat diets on mood and learning performance in adolescent mice. *Behav. Brain Res.* **311:** 167-172

Roe C (2017) Unwrapping Neurotrophic Cytokines and Histone Modification. *Cell. Mol. Neurobiol.* **37:**

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS & Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273:** 5858-5868

Roos WP, Thomas AD & Kaina B (2016) DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **16:** 20-33

Rossetto D, Truman AW, Kron SJ & Côté J (2010) Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin. Cancer Res.* **16:** 4543-4552

Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z & Burdak-Rothkamm S (2015) DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ. Mol. Mutagen.* **56:** 491-504

Rubin SA, Sylves P, Vogel M, Pletnikov M, Moran TH, Schwartz GJ & Carbone KM (1999) Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res. Bull.* **48:** 23-30

Ryan EL, Hollingworth R & Grand RJ (2016) Activation of the DNA damage response by RNA viruses. *Biomolecules* **6:** 2-24

_____S_____

Sabedra Sousa FS, Birmann PT, Bampi SR, Fronza MG, Balaguez R, Alves D, Leite MR, Nogueira CW, Brüning CA & Savegnago L (2019) Lipopolysaccharide-induced depressive-like, anxiogenic-like and hyperalgesic behavior is attenuated by acute administration of α-(phenylselanyl) acetophenone in mice. *Neuropharmacology* **146:** 128-137

Saha J & Davis AJ (2016) Unsolved mystery: The role of BRCA1 in DNA end-joining. In *Journal of Radiation Research* p i18-i24. Oxford University Press

Saijo K & Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11:** 775-787

Sasaki S & Ludwig H (1993) In Borna Disease Virus Infected Rabbit Neurons 100 nm Particle Structures Accumulate at Areas of Joest-Degen Inclusion Bodies. *J. Vet. Med. Ser. B* **40:** 291-297

Sauder C & Staeheli P (2003) Rat Model of Borna Disease Virus Transmission: Epidemiological Implications. *J. Virol.* **77:** 12886-12890

Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Møllgård K & Bauer HC (2014) The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: A walk through 100 years of history. *Front. Neurosci*. **8:**

Schlottau K, Forth L & Beer M (2018) Fatal Encephalitic Borna Disease Virus 1 in Solid-Organ Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **5:** 3-5

Schneemann A, Schneider PA, Kim S & Lipkin WI (1994) Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68:** 6514-6522 Available at: http://jvi.asm.org/

Schneider PA, Schneemann A & Lipkin WI (1994) RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* **68:** 5007-5012 Available at: http://jvi.asm.org/

Schreiber JA, Schepmann D, Frehland B, Thum S, Datunashvili M, Budde T, Hollmann M, Strutz-Seebohm N, Wünsch B & Seebohm G (2019) A common mechanism allows

selective targeting of GluN2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Commun. Biol.* **2:**

Schueller E, Paiva I, Blanc F, Wang XL, Cassel JC, Boutillier AL & Bousiges O (2020) Dysregulation of histone acetylation pathways in hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **33:** 101-116

Schwardt M, Mayer D, Frank R, Schneider U, Eickmann M, Planz O, Wolff T & Schwemmle M (2005) The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J. Gen. Virol.* **86:** 3163-3169

Schwemmle M, De Bishnu, Shi L, Banerjee A & Lipkin WI (1997) Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cε and casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **272:** 21818-21823 Available at: http://www.jbc.org

Schwemmle M, Jehle C, Formella S & Staeheli P (1999) Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* **354:** 1973-1974

Scordel C, Huttin A, Cochet-Bernoin M, Szelechowski M, Poulet A, Richardson J, Benchoua A, Gonzalez-Dunia D, Eloit M & Coulpier M (2015) Borna Disease Virus Phosphoprotein Impairs the Developmental Program Controlling Neurogenesis and Reduces Human GABAergic Neurogenesis. *PLoS Pathog.* **11:**

Shanbhag NM, Evans MD, Mao W, Nana AL, Seeley WW, Adame A, Rissman RA, Masliah E & Mucke L (2019) Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **7:**

Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM & Greenberg RA (2010) ATM-Dependent chromatin changes silence transcription in cis to dna double-strand breaks. *Cell* **141:** 970-981

Sheline YI (2011) Depression and the hippocampus: Cause or effect? *Biol. Psychiatry* **70:** 308-309

Shi M, Lin XD, Chen X, Tian JH, Chen LJ, Li K, Wang W, Eden JS, Shen JJ, Liu L, Holmes EC & Zhang YZ (2018) The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556:** 197-202

Shimizu Y, Luk H, Horio D, Miron P, Griswold M, Iglehart D, Hernandez B, Killeen J & ElShamy WM (2012) BRCA1-IRIS overexpression promotes formation of aggressive breast cancers. *PLoS One* **7:**

Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA & Cunningham C (2013) A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF-α and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. *PLoS One* **8:**

Smith DE, Lipsky BP, Russell C, Ketchem RR, Kirchner J, Hensley K, Huang Y, Friedman WJ, Boissonneault V, Plante MM, Rivest S & Sims JE (2009) A Central Nervous System-Restricted Isoform of the Interleukin-1 Receptor Accessory Protein Modulates Neuronal Responses to Interleukin-1. *Immunity* **30:** 817-831

Sochocka M, Diniz BS & Leszek J (2017) Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol. Neurobiol.* **54:** 8071-8089

Södersten E, Toskas K, Rraklli V, Tiklova K, Björklund ÅK, Ringnér M, Perlmann T & Holmberg J (2018) A comprehensive map coupling histone modifications with gene regulation in adult dopaminergic and serotonergic neurons. *Nat. Commun.* **9:**

Solbrig M V. & Koob GF (2003) Neuropharmacological sequelae of persistent CNS viral infections: Lessons from Borna Disease Virus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **74:** 777-787

Song W, Kao W, Zhai A, Qian J, Li Y, Zhang Q, Zhao H, Hu Y, Li H & Zhang F (2013) Borna disease virus nucleoprotein inhibits type I interferon induction through the interferon regulatory factor 7 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438:** 619-623

Sparkman NL, Kohman RA, Scott VJ & Boehm GW (2005) Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. *Physiol. Behav.* **86:** 244-251

Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ & Friedman W (2004) Cell type-specific interleukin-1β signaling in the CNS. *J. Neurosci.* **24:** 6482-6488

Stenglein MD, Leavitt EB, Abramovitch MA, McGuire JA & DeRisi JL (2014) Genome sequence of a bornavirus recovered from an African garter snake (Elapsoidea loveridgei). *Genome Announc.* **2:**

Stinson BM, Moreno AT, Walter JC & Loparo JJ (2020) A Mechanism to Minimize Errors during Non-homologous End Joining. *Mol. Cell* **77:** 1080-1091.e8

Stitz L, Bilzer T & Planz O (2002) The immunopathogenesis of Borna disease virus infection

Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403:** 41-45 Available at: www.nature.com

Stucki M & Jackson SP (2006) γH2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst).* **5:** 534-543

Suberbielle E, Djukic B, Evans M, Kim DH, Taneja P, Wang X, Finucane M, Knox J, Ho K, Devidze N, Masliah E & Mucke L (2015) DNA Repair Factor BRCA1 Depletion Occurs in Alzheimer Brains and Impairs Cognitive Function in Mice. *Nat. Commun.* **6:** 1-14 Available at: http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9897

Suberbielle E, Sanchez PE, Kravitz A V., Wang X, Ho K, Eilertson K, Devidze N, Kreitzer AC & Mucke L (2013) Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-β. *Nat. Neurosci.* **16:** 613-621

Suberbielle E, Stella A, Pont F, Monnet C, Mouton E, Lamouroux L, Monsarrat B & Gonzalez-Dunia D (2008) Proteomic Analysis Reveals Selective Impediment of Neuronal Remodeling upon Borna Disease Virus Infection. *J. Virol.* **82:** 12265-12279

Sun GQ, Yu RT, Evans RM & Shi Y (2007) Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104:** 15282-15287

Sun Y, Xu Y, Cheng X, Chen X, Xie Y, Zhang L, Wang L, Hu J & Gao Z (2018) The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. *J. Neurosci. Res.* **96:** 1430-1443

Szelechowski M, Bétourné A, Monnet Y, Ferré CA, Thouard A, Foret C, Peyrin J-M, Hunot S & Gonzalez-Dunia D (2014) A viral peptide that targets mitochondria protects against neuronal degeneration in models of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **5:** 5181 Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms6181

_____T_____

Takemiya T, Fumizawa K, Yamagata K, Iwakura Y & Kawakami M (2017) Brain interleukin-1 facilitates learning of a water maze spatial memory task in Young Mice. *Front. Behav. Neurosci.* **11:**

Tatu L & Vuillier F (2014) Structure and vascularization of the human hippocampus. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* p 18-25. S. Karger AG

Thadathil N, Delotterie DF, Xiao J, Hori R, McDonald MP & Khan MM (2021) DNA Double-Strand Break Accumulation in Alzheimer's Disease: Evidence from Experimental Models and Postmortem Human Brains. *Mol. Neurobiol.* **58:** 118-131

Thomas GM & Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **5:** 173-183

Thome JG, Reeder EL, Collins SM, Gopalan P & Robson MJ (2020) Contributions of Interleukin-1 Receptor Signaling in Traumatic Brain Injury. *Front. Behav. Neurosci.* **13:**

Tiwari VK, Burger L, Nikoletopoulou V, Deogracias R, Thakurela S, Wirbelauer C, Kaut J, Terranova R, Hoerner L, Mielke C, Boege F, Murr R, Peters AHFM, Barde YA & Schübeler D (2012) Target genes of Topoisomerase IIβ regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109:**

Tizard I, Ball J, Stoica G & Payne S (2016) The pathogenesis of bornaviral diseases in

mammals. *Anim. Heal. Res. Rev.* **17:** 92-109

Tollervey JR & Lunyak V V. (2012) Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* **7:** 823-840

Tomonaga K, Kobayashi T & Ikuta K (2002) Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection Available at: www.elsevier.com/locate/micinf

Tong L, Aleph Prieto G, Kramár EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G & Cotman CW (2012) Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* **32:** 17714-17724

Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A & Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* **31:** 16064-16069

Turnell AS & Grand RJ (2012) DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J. Gen. Virol.* **93:** 2076-2097

_____U_____

Unterstab G, Ludwig S, Anton A, Planz O, Dauber B, Krappmann D, Heins G, Ehrhardt C & Wolff T (2005) Viral targeting of the interferon-β-inducing Traf family member-associated NF-κB activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **102:** 13640-13645 Available at: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0502883102

_____V_____

Varatharaj A & Galea I (2017) The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* **60:** 1-12

Vasudevan S (2012) Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3:** 311-330

Vilenchik MM & Knudson AG (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100:** 12871-12876 Available at: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.2135498100

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani a, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL & Marinovich M (2003) Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* **23:** 8692-8700

Vogel-Ciernia A & Wood MA (2014) Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2014:** 8.31.1-8.31.17

Volmer R, Monnet C & Gonzalez-Dunia D (2006) Borna disease virus blocks potentiation of

presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS Pathog.* **2:** e19 Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1401496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Volmer R, Prat CMA, Le Masson G, Garenne A & Gonzalez-Dunia D (2007) Borna Disease Virus Infection Impairs Synaptic Plasticity. *J. Virol.* **81:** 8833-8837

_____W_____

Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* **41:** 10-13

Wang X, Zhang C, Szábo G & Sun QQ (2013) Distribution of CaMKIIα expression in the brain in vivo, studied by CaMKIIα-GFP mice. *Brain Res.* **1518:** 9-25

Watanabe M, Tsutsui K, Tsutsui K & Inoue Y (1994) Differential expressions of the topoisomerase IIc and II /mRNAs in developing rat brain

Watanabe M, Zhong Q, Kobayashi T, Kamitani W, Tomonaga K & Ikuta K (2000) Molecular Ratio between Borna Disease Viral-p40 and-p24 Proteins in Infected Cells Determined by Quantitative Antigen Capture ELISA. *Microbiol. Immunol.* **44:** 765-772

Watt G, Przybyla M, Zak V, van Eersel J, Ittner A, Ittner LM & Karl T (2020) Novel Behavioural Characteristics of Male Human P301S Mutant Tau Transgenic Mice – A Model for Tauopathy. *Neuroscience* **431:** 166-175

Weber A, Wasiliew P & Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.* **3:**

Wei CW, Luo T, Zou SS & Wu AS (2018) The role of long noncoding RNAs in central nervous system and neurodegenerative diseases. *Front. Behav. Neurosci.* **12:**

Wei JW, Huang K, Yang C & Kang CS (2017) Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol. Rep.* **37:** 3-9

Weitzman MD & Fradet-Turcotte A (2018) Virus DNA replication and the host DNA damage response. *Annu. Rev. Virol.* **5:** 141-164

Weyemi U, Paul BD, Snowman AM, Jailwala P, Nussenzweig A, Bonner WM & Snyder SH (2018) Histone H2AX deficiency causes neurobehavioral deficits and impaired redox homeostasis. *Nat. Commun.* **9:**

Wood IC (2018) The contribution and therapeutic potential of epigenetic modifications in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **12:** 1-11

Wright WD, Shah SS & Heyer WD (2018) Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **293:** 10524-10535

_____X_____

Xu P, Liu Q, Xie Y, Shi X, Li Y, Peng M, Quo H, Sun R, Li J, Hong Y, Liu X & Xu G (2018) Breast cancer susceptibility protein 1 (BRCA1) rescues neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury through NRF2-mediated antioxidant pathway. *Redox Biol.* **18:** 158-172

_____Y_____

Yamato M & Kataoka Y (2015) Fatigue sensation following peripheral viral infection is triggered by neuroinflammation: Who will answer these questions? *Neural Regen. Res.* **10:** 203-204

Yan X, Yadav R, Gao M & Weng HR (2014) Interleukin-1 beta enhances endocytosis of glial glutamate transporters in the spinal dorsal horn through activating protein kinase C. *Glia* **62:** 1093-1109

Yang G, Liu C, Chen SH, Kassab MA, Hoff JD, Walter NG & Yu X (2018) Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Res.* **46:** 3446-3457

Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G & Zheng JC (2013) IL-1β and TNF-α induce neurotoxicity through glutamate production: A potential role for neuronal glutaminase. *J. Neurochem.* **125:** 897-908

Yirmiya R, Weidenfeld J, Pollak Y, Morag M, Morag A, Avitsur R, Barak O, Reichenberg A, Cohen E, Shavit Y & Ovadia H (1999) Cytokines, « depression due to a general medical condition, » and antidepressant drugs. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* p 283-316.

_____Z_____

Zhang H, He P, Huang R, Sun L, Liu S, Zhou J, Guo Y, Yang D & Xie P (2016) Identification and bioinformatic analysis of dysregulated microRNAs in human oligodendroglial cells infected with borna disease virus. *Mol. Med. Rep.* **14:** 4715-4722

Zhang X, Guo Y, Xu X, Tang T, Sun L, Wang H, Zhou W, Fang L, Li Q & Xie P (2019) miR-146a promotes Borna disease virus 1 replication through IRAK1/TRAF6/NF-κB signaling pathway. *Virus Res.* **271:**

Zhu C Bin, Blakely RD & Hewlett WA (2006) The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* **31:** 2121-2131

Zimmermann W, Breter H, Rudolph M & Ludwig H (1994) Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J. Virol.* **68:** 6755-6758 Available at: http://jvi.asm.org/

Zola-Morgan S, Squire LR & Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6:** 2950-2967

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, Thuret S, Price J & Pariante CM (2012) Interleukin-1β: A new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **37:** 939-949

Zwick, W., Seifried O., and Witte J. (1927) Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn- und RÜckenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Z. Infrkh. Haustiere 30, 42-136

TITLE:

Neuronal DNA double-strand breaks: a common role in the pathophysiology of Bornavirus and chronic neuroinflammation

ABSTRACT:

Viral infections and inflammation disrupt neuronal function, leading to behavioral and cognitive deficits. Although the underlying mechanisms remain to be fully uncovered, we already know that these pathological conditions impair neuronal epigenetics. Recently, DNA double-strand breaks (DSB) have been identified as un central regulator of neuronal epigenetic. In non-pathological conditions, neuronal activity induces the generation of DSB, which are quickly and efficiently repaired. The balance between DSB production and repair ensures a proper functioning of neurons. In this context, my Ph.D. project consisted in studying the impact of a viral infection or neuroinflammation on this balance and analyze their contribution of the latter on neuronal function or behavior.

First, we studied the neuronal infection by the Borna disease virus (BoDV). This negative single stranded RNA neurotropic virus persists in the nervous system without inducing neuronal death. BoDV is singular as it replicates in the nucleus, in close interaction with cellular chromatin. We showed that BoDV infection increases DSB levels in primary cultures of rat neurons. We also discovered that DSB are used as platforms for the assembly of viral factories, thereby promoting viral replication. In addition, BoDV-infected neurons display reduced spontaneous electrical activity and impaired response to the stimulation of neurotransmission. At the molecular level, these alterations are linked to a loss of surface expression of the receptor to neurotransmitter glutamate, a receptor which is critically involved in neuronal plasticity and DSB production. Altogether, our results suggest the existence of a novel feedback loop mechanism to control viral replication, by inhibiting the induction of activity-dependent DSB to promote BoDV persistence.

Independently of viral infections, neurological impairments are also observed in the course of chronic neuroinflammation. We asked whether the neurological symptoms that accompany chronic neuroinflammation may, in fact, result from alterations in DSB levels. In primary cultures of mouse neurons, we showed that interleukin-1β (IL-1β), one of the main proinflammatory cytokines in neuroinflammation, increase DSB levels in neurons. In order to study mouse behavior upon chronic treatment by IL-1β, we have implemented an in-house behavioral core facility allowing for testing memory- and anxiety-related behaviors. We then carried out experiments of chronic exposure of mice to IL-1β, using subcutaneously-implanted osmotic minipumps. We showed that IL-1β treated-mice exhibit a lack of hippocampal dependent-spatial memory, accompanied by increased numbers of neurons with DSB in the hippocampus. Finally, thanks to conditional and inducible transgenic mouse models, we showed that knocking-out neuronal signaling pathways mediated by IL-1β, or by DSB, prevent IL-1β-dependent deleterious impact on memory.

In conclusion, our work provides a better understanding of how, under pathological conditions, cognitive functions can be disrupted, and will allow ultimately, the identification of key factors of the regulatory processes of these mechanisms.

KEYWORDS: Neurons, Epigenetics, Virus, Inflammation, Behavior

AUTEUR : Florent MARTY

TITRE : Cassures double-brin de l'ADN des neurones : un rôle commun dans la physiopathologie de l'infection par le Bornavirus et l'inflammation chronique

DIRECTRICE DE THESE : Docteur Elsa SUBERBIELLE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 05 Juillet 2021, Toulouse

RESUME :

Plusieurs situations pathologiques, comme certaines maladies infectieuses ou inflammatoires, conduisent à des perturbations de la fonction neuronale ou à des troubles du comportement et de la cognition. L'origine de ces perturbations est complexe et mal comprise, mais nous savons qu'elles sont liées à des modifications de l'épigénétique neuronale. Récemment, les cassures double-brin (CDB) de l'ADN ont été identifiées comme un régulateur central de l'épigénétique neuronale. Il est désormais établi que l'équilibre entre la production de CDB, suite à l'activité neuronale, et leur réparation efficace garantissent le bon fonctionnement des neurones. Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à étudier l'impact d'une infection virale ou de la neuroinflammation sur cet équilibre et d'analyser les conséquences sur le fonctionnement neuronal et le comportement.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'infection neuronale par le Bornavirus (BoDV). Ce virus neurotrope à ARN négatif simple brin persiste dans le système nerveux sans induire de mort neuronale. Une autre originalité du BoDV est qu'il se réplique dans le noyau, en étroite interaction avec la chromatine cellulaire. Nos résultats montrent que l'infection de cultures de neurones primaires de rat par le BoDV augmente le taux de CDB. Nous avons également découvert que les CDB servent de plateforme pour l'assemblage des usines de réplication virales, favorisant ainsi la réplication du virus. Par ailleurs, les neurones infectés par le BoDV présentent une activité électrique spontanée réduite et un défaut de réponse à la stimulation de la neurotransmission. Ces perturbations sont liées à la perte de l'expression en surface des neurones de récepteurs au neurotransmetteur glutamate impliqués dans la plasticité neuronale et la production de CDB. Nos résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme inédit de "rétrocontrôle" de la réplication virale, qui, en inhibant la production de CDB dépendantes de l'activité, favoriserait la persistance.

Indépendamment des infections virales, des troubles neurologiques sont également observés lors de la neuroinflammation chronique. Nous nous sommes demandés si les troubles neurologiques, observés lors de la neuroinflammation chronique, ne pouvaient pas également être liés à une perturbation des CDB. Dans des cultures primaires de neurones de souris, nous avons mis en évidence que l'interleukine-1β (IL-1β), une des principales cytokines de la neuroinflammation, augmentait les niveaux de CDB. Afin d'étudier le comportement de souris traitées chroniquement par de l'IL-1β, nous avons mis en place une plateforme dédiée disposant de tests permettant d'évaluer la mémoire et l'anxiété. *In vivo* chez la souris, nous avons montré que l'infusion chronique de cette cytokine à l'aide de mini-pompes osmotiques implantées sous la peau perturbe la mémorisation spatiale dépendant de l'hippocampe et augmente le nombre de neurones présentant des CDB dans cette structure cérébrale. Enfin, nous avons montré, à l'aide de modèles conditionnels et inductibles de souris transgéniques, que le blocage de la signalisation médiée par l'IL-1β, ou par les CDB, prévient les effets délétères de l'IL-1β sur la mémorisation.

Ces travaux ont permis de mieux comprendre comment les fonctions cognitives peuvent être altérées en conditions pathologiques, et pourraient conduire, à terme, à identifier les facteurs clés qui les régulent.

MOTS CLEFS : Neurone, Épigénétique, Virus, Inflammation, Comportement

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Neuroscience, Virologie, Immunologie

---

INFINITy - Inserm UMR 1291 - CNRS UMR 5051 - Université Toulouse III
Team VIral infection and Neuronal DYSfunction (ViNeDys)
CHU Purpan - BP 3028
31024 Toulouse Cedex 3
FRANCE