THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Cibles moléculaires et thérapeutique de la maladie d'Alzheimer - CiMoTheMA (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Vincent Maleysson

Développement et caractérisation d'un nouveau modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer chez le rat non transgénique

Directeur(s) de Thèse :
Bernard Fauconneau, Pascal Champeroux

Soutenue le 06 janvier 2016 devant le jury

Jury :

Président	**Sylvie Chalon**	Directeur de recherche INSERM, Université de Tours
Rapporteur	**Tangui Maurice**	Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier 2
Rapporteur	**Catherine Heurteaux**	Directeur de recherche CNRS, Université de Nice
Membre	**Bernard Fauconneau**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Pascal Champeroux**	Directeur scientifique, CERB de Baugy

Pour citer cette thèse :
Vincent Maleysson. *Développement et caractérisation d'un nouveau modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer chez le rat non transgénique* [En ligne]. Thèse Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2016. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

U.F.R. MEDECINE ET PHARMACIE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

Discipline : Neurosciences

Développement et caractérisation d'un nouveau modèle expérimental de la maladie d'Alzheimer chez le rat non transgénique

Présentée et soutenue publiquement

Par

Vincent MALEYSSON

Le 6 janvier 2016

JURY

Dr. Catherine HEURTEAUX	DR UMR-CNRS 6097-Nice	Rapporteur
Dr. Tangui MAURICE	DR CNRS, INSERM U1198-Montpellier	Rapporteur
Dr. Sylvie CHALON	DR INSERM U930-Tours	Examinateur
Dr. Pascal CHAMPEROUX	DR CERB-Baugy	Co-directeur
Pr. Bernard FAUCONNEAU	PR Universitaire-Poitiers	Directeur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Bernard Fauconneau, mon directeur de thèse, pour avoir accepté d'encadrer ces travaux et pour les longues heures passer au téléphone à disserter sur les mécanismes de la MA et les orientations à prendre dans mes recherches.

Je remercie le Dr. Pascal Champeroux, directeur de recherche du CERB et co-directeur de cette thèse, pour son encadrement, son expertise scientifique et son soutient dans la mise en place des différentes expérimentations réalisées.

Je remercie le Pr. Guylène Page, directrice du CiMoTheMA, pour la transmission de son savoir au sujet de la MA et des chirurgies stéréotaxiques, ainsi que pour son accueil au sein de l'université de Poitiers.

Je tiens à remercier vivement le Dr. Serge Richard, PDG du CERB, pour le financement de ces travaux et toute la confiance qu'il m'a accordé.

Je remercie également les rapporteurs : le Dr. Catherine Heurteaux et le Dr. Tangui Maurice, pour avoir accepté d'évaluer cette thèse ; ainsi que le Dr. Sylvie Chalon, pour avoir présidé le jury.

J'adresse un grand merci à ma compagne, Lydie Allard, qui m'a supporté pendant ces longues mais passionnantes années de travaux et qui a également apporté une contribution précieuse à la recherche bibliographique et aux figures présentes dans ce manuscrit.

Je n'oublie pas de remercier Obélia Haïda, pour sa contribution au développement de ce modèle et notamment pour ses travaux réalisés sur les enregistrements d'EEG dont j'ai été l'encadrant lors de son stage de Master effectués au sein du CERB.

Je remercie toute l'équipe du CERB, pour son soutient et son expertise technique, notamment Emmanuel Bracq, pour m'avoir assisté à de nombreuses reprises au niveau de l'organisation et du déroulement des expérimentations, Stéphanie Clévenot, pour son aide précieuse apportée lors des chirurgies, Armel Dumay, pour ses nombreuses heures passées à réaliser des coupes histologiques de grande qualité, et enfin le Dr. Anne Maurin, pour ses conseils avisés et son expérience concernant l'encadrement d'équipe.

J'adresse toute ma gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire CiMoTheMA, pour leur accueil et leur gentillesse, et particulièrement au Dr. Thierry Jannet, pour ses conseils sur l'importance du pot de thèse et dont j'espère qu'ils auront été honorés, ainsi qu'à Damien Chassaing, pour son temps consacré aux analyses biochimiques, mais également et surtout pour ses apéritifs passés en discutant du Sud-ouest de la France.

Enfin je tiens à remercier mes parents ainsi que toutes les personnes présentent lors de ma soutenance et qui ont participé à l'organisation et au bon déroulement du pot de thèse.

Sommaire

Liste des abréviations 1
Avant propos 3
Partie 1 : Introduction et généralités 4
1. La maladie d'Alzheimer 5
1.1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer 5
1.2. Plus d'un siècle de recherche 7
1.3. Physiopathologie de la MA 8
1.3.1. Les différents acteurs de la maladie 8
1.3.1.1. Les dépôts amyloïdes 8
1.3.1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) 15
1.3.1.3. Les plaques séniles (PS) 19
1.3.1.4. Les autres protéinopathies 19
1.3.2. Une propagation spatio-temporelle spécifique de la maladie 20
1.3.2.1. Progression spatio-temporelle des DNF 20
1.3.2.2. Progression spatio-temporelle des dépôts amyloïdes 22
1.3.2.3. Progression spatio-temporelle des plaques séniles 23
1.3.2.4. Progression des signes cliniques de la MA 23
1.3.2.5. Corrélation entre les stades de la MA et la progression des lésions 24
1.3.3. Lien entre Aβ et Tau 25
1.3.3.1. Hypothèse de la cascade amyloïde 25
1.3.3.2. Synergie entre Aβ et Tau 27
2. Les modèles expérimentaux de la MA 28
2.1. Modèles in vitro et ex vivo 28
2.2. Modèles animaux 30
2.2.1. Naturels 30
2.2.2. Par injections d'agents pharmacologiques mimant certaines caractéristiques de la MA 31
2.2.3. Par injection de peptide Aβ 33
2.2.4. Par injection de la protéine Tau 36
2.2.5. Animaux transgéniques 36
2.2.5.1. Modèles basés sur une surexpression de peptide Aβ chez la souris 37
2.2.5.2. Modèles basés sur une surexpression de tau chez la souris 40
2.2.5.3. Modèles basés sur des protéinopathies multiples chez la souris 41
2.2.5.4. Modèles de rats transgéniques 42
2.2.6. Par transfert de gène 43
2.3. Avantages et inconvénients des différents modèles 45
2.4. Choix du modèle : 47
3. Evaluation de la mémoire chez les modèles animaux de la MA 48
3.1. Généralité sur la mémoire en expérimentation animale 48
3.1.1. Les différents types de mémoire 48
3.1.2. Les différents types de mémoire en expérimentation animale 48
3.1.3. Rôle de l'hippocampe dans la mémorisation 49

3.1.3.1. Anatomie de l'hippocampe 49
3.1.3.2. Lien entre hippocampe et mémoire 50
3.1.3.3. La potentialisation à long terme 51
3.1.3.4. Lien entre potentialisation à long terme et mémoire 52
3.1.3.5. L'hippocampe : une cible potentielle pour la modélisation de la maladie d'Alzheimer 53
3.2. Les principaux tests d'évaluation de la mémoire chez le rongeur 53
3.2.1. Les tests à renforcement positif 54
3.2.1.1. Exploration de la mémoire spatiale 54
3.2.1.2. Exploration de la mémoire non spatiale 55
3.2.2. Les tests à renforcement négatif 55
3.2.2.1. Exploration de la mémoire spatiale 55
3.2.2.2. Exploration de la mémoire non spatiale 57
3.2.3. Les tests sans renforcement 58
3.2.3.1. Exploration de la mémoire spatiale 58
3.2.3.2. Exploration de la mémoire non spatiale 59
3.3. Avantages et inconvénients des principaux tests 59
4. Electroencéphalographie et maladie d'Alzheimer 61
4.1. Généralité sur les électroencéphalogrammes 61
4.2. Revue bibliographique des perturbations mesurables par EEG dans la MA 62
4.3. Revue bibliographique d'analyses d'EEG dans des modèles animaux de la MA 63
4.4. Lien entre mémoire et REM 65
4.5. Lien entre hippocampe, REM et rythmes thêta 65
Partie 2 : Expérimentation 68
5. Objectifs 69
6. Etude préliminaire 69
6.1. Introduction 69
6.2. Matériels et méthodes 70
6.2.1. Plan expérimental 70
6.2.2. Animaux 71
6.2.3. Injection stéréotaxique 71
6.2.4. Substances injectées 73
6.2.5. Test d'évaluation de la mémoire : Morris Water Maze 74
6.2.6. Immunohistochimie 74
6.2.7. Présentation et analyse des résultats 75
6.3. Résultats 77
6.3.1. Suivi du poids 77
6.3.2. Evaluation des lésions histologiques 78
6.3.3. Evaluation de la mémoire 80
6.4. Discussion 81
7. Etapes de mise au point 83
7.1. Injection intrahippocampique 83
7.2. Validation d'un test de mémoire à l'aide d'une substance de référence 84
7.2.1. Premier protocole de RAWM testé 85
7.2.2. Second protocole de RAWM testé 88

7.2.3. Conclusion 89
8. Expérience n°1 90
8.1. Introduction 90
8.2. Matériels et méthodes 90
8.3. Résultats 91
8.3.1. Suivi du poids 91
8.3.2. Observation histologique des différentes lésions 92
8.3.3. Evaluation de la mémoire 96
8.4. Discussion 99
9. Expérience n°2 101
9.1. Introduction 101
9.2. Matériels et méthodes 101
9.3. Résultats 102
9.3.1. Suivi du poids 102
9.3.2. Observation histologique des différentes lésions 102
9.3.3. Evaluation de la mémoire 104
9.4. Discussion 105
10. Amélioration du test du RAWM à l'aide d'une substance de référence 107
11. Expérience n°3 110
11.1. Introduction 110
11.2. Matériels et méthodes 110
11.3. Résultats 114
11.3.1. Suivi de l'évolution pondérale des animaux 114
11.3.2. Analyse biochimique du peptide Aβ injecté 114
11.3.3. Observation histologique des différentes lésions 116
11.3.4. Analyse biochimique 117
11.3.5. Evaluation de la mémoire 118
11.4. Discussion 119
12. Expérience n°4 121
12.1. Introduction 121
12.2. Matériels et méthodes 121
12.2.1. Procédure expérimentale 121
12.2.2. Technique de télémétrie 122
12.2.3. Implantation des électrodes et de l'émetteur. 122
12.2.4. Enregistrements des EEG 123
12.2.5. Présentation et analyse des enregistrements d'EEG 123
12.3. Résultats 124
12.3.1. Suivi du poids 124
12.3.2. Analyse des enregistrements d'EEG 124
12.3.3. Evaluation de la mémoire 126
12.4. Discussion 126
13. Expérience n°5 127
13.1. Introduction 127
13.2. Matériels et méthodes 127
13.3. Résultats 128

13.3.1. Suivi du poids 128
13.3.2. Evaluation des lésions histologiques 129
13.3.3. Analyse des enregistrements d'EEG 130
13.3.4. Evaluation de la mémoire 131
13.4. Discussion 131
14. Etude de l'effet d'un inhibiteur cholinergique sur les EEG 132
14.1. Introduction 132
14.2. Matériels et méthodes 132
14.3. Résultats 132
14.4. Discussion 133
Partie 3 : Discussion générale et perspectives 134
15. Discussion 135
16. Perspectives 142
Partie 4 : Publication 143
Partie 5 : Références bibliographiques 178

Liste des figures

Figure 1 : Atrophie du cerveau observée par IRM dans la MA 5
Figure 2 : Dessin original des neurofilaments observés par Aloïs Alzheimer..... 7
Figure 3 : Schéma représentatif de la voie amyloïdogénique et de la voie non-amyloïdogénique.... 8
Figure 4 : Les trois lésions histologiques de type amyloïde..... 9
Figure 5 : Représentation schématique de l'agrégation du peptide Aβ. 10
Figure 6 : Structure en PHF de la protéine Tau. 15
Figure 7 : Les quatre lésions histologiques de type DNF. 15
Figure 8 : Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau..... 16
Figure 9 : Représentation schématique de la déstabilisation du microtubule induit par la phosphorylation de la protéine Tau. 16
Figure 10 : Les six stades de propagation des DNF de Braak et Braak..... 20
Figure 11 : Schéma représentatif de la région rhinale et de l'hippocampe. 20
Figure 12 : Les trois stades de propagation des dépôts amyloïdes de Braak et Braak. 22
Figure 13 : Progression des dépôts amyloïde : stades de Thal..... 23
Figure 14 : Dénombrement des plaques séniles : méthode CERAD. 23
Figure 15 : Apparition des plaques amyloïdes et de la démence en fonction de l'âge..... 24
Figure 16 : Corrélation entre la durée de la maladie, la densité des NFT, la charge amyloïde et la perte neuronale. 24
Figure 17 : Corrélation entre les plaques séniles, les stades de Braak et Braak, et le déclin cognitif. 25
Figure 18 : Première apparition du concept de la cascade amyloïde..... 25
Figure 19 : Représentation hypothétique de la synergie entre le peptide Aβ et la protéine Tau. ... 27
Figure 20 : Les différents types de mémoire. 48
Figure 21 : Schéma représentatif de la boucle trisynaptique formée par l'hippocampe..... 49
Figure 22 : Schéma représentatif de l'induction de la LTP et de ses mécanismes..... 51
Figure 23 : Photographie d'un Radial Arm Maze à huit bras. 54
Figure 24 : Photographie d'une Operant Chamber..... 55
Figure 25 : Photographie d'un Morris Water Maze. 55
Figure 26 : Photographie d'un Radial Arm Water Maze à six bras..... 56
Figure 27 : Photographie d'un Barnes Maze. 56
Figure 28 : Représentation schématique du test de Passive Avoidance. 57
Figure 29 : Représentation schématique du test de Fear Conditionning..... 58
Figure 30 : Photographie d'un T Maze. 58
Figure 31 : Représentation schématique du test de Novel Object Reconition. 59
Figure 32 : Représentation schématique de la boucle trisynaptique de l'hippocampe et de son innervation provenant du septum médial. 66
Figure 33 : Schéma hypothétique du rôle du REM et des fibres cholinergiques dans la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe. 67
Figure 34 : Représentation schématique du site d'injection intrahippocampique. 71
Figure 35 : Etat d'agrégation du peptide β-amyloïde 1-42 dilué dans l'eau distillée. 73
Figure 36 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux..... 77
Figure 37 : Marquage de la protéine Tau phoshorylée réalisé avec l'anticorps AD2..... 78

Figure 38 : Marquage de la protéine Tau phosphorylée par l'anticorps AT100. 79
Figure 39 : Marquage du peptide Aβ par l'anticorps 4G8..... 79
Figure 40 : Résultats de la phase d'apprentissage du test de mémoire. 80
Figure 41 : Résultats du test de rétention. 80
Figure 42 : Mobilité électrophorétique des différentes isoformes de la protéine Tau et influence du niveau de phosphorylation. 81
Figure 43 : Site d'injection de l'étude de mise au point. 83
Figure 44 : Site d'injection validé pour les prochaines expériences. 83
Figure 45 : Différents types de pointe d'aiguille Hamilton utilisés pour les injections intracérébrales. 83
Figure 46 : Photographie du dispositif de Radial Arm Water Maze 84
Figure 47 : Schéma du premier protocole d'évaluation de la mémoire utilisant le RAWM. 85
Figure 48 : Schéma du second protocole d'évaluation de la mémoire utilisant le RAWM. 85
Figure 49 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à plusieurs positions de départ. 87
Figure 50 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage. 87
Figure 51 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à une position de départ. 88
Figure 52 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage. 89
Figure 53 : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°1 91
Figure 54 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°1. 91
Figure 55 : Co-marquage du peptide Aβ et de la protéine Tau phosphorylée au niveau du site d'injection. 92
Figure 56 : Aspect morphologique de la couche CA1 et du gyrus denté. 93
Figure 57 : Lésions de type neurofibrillaire. 94
Figure 58 : Réaction gliale associée aux deux types de lésions. 95
Figure 59 : Dépôt vasculaire. 95
Figure 60 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à deux semaines post-injection. 96
Figure 61 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après deux semaines post-injection. 96
Figure 62 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à six semaines post-injection. 97
Figure 63 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après six semaines post-injection. 97
Figure 64 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à 12 semaines post-injection. 98
Figure 65 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après 12 semaines post-injection. 98
Figure 66 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°2. 102
Figure 67 : Marquage de la protéine Tau phosphorylée et du peptide Aβ au niveau du gyrus denté. 103
Figure 68 : Co-marquage du peptide Aβ et de la protéine Tau phosphorylée. 103
Figure 69 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à une position de plateforme. 104

Figure 70 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.....104
Figure 71 : Schéma de la procédure de RAWM à trois positions de plateforme.....107
Figure 72 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à trois positions de plateforme.....108
Figure 73 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.....109
Figure 74 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°3.....114
Figure 75 : Etat d'agrégation du peptide β-amyloïde 1-42 dilué dans le Ringer lactate. 114
Figure 76 : Co-marquage des lésions de type dépôt amyloïde et neurofibrillaire avec les astrocytes ou les cellules microgliales.....115
Figure 77 : Comparaison des marquages de la protéine Tau phosphorylée ainsi que de la réaction gliale associée, chez les groupes Tau et Abeta-Tau. 116
Figure 78 : Co-marquage de la protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée. 116
Figure 79 : Résultats des analyses biochimiques réalisées sur les hippocampes de chaque groupe. 117
Figure 80 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire. 118
Figure 81 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.....118
Figure 82 : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°4 121
Figure 83 : Implantation du radio-émetteur et des électrodes et présentation du poste d'enregistrement des EEG.....122
Figure 84 : Représentation schématique de la méthode de détermination informatique des quatre états. 123
Figure 85 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°4.....124
Figure 86 : Proportion des différents états de chaque groupe sur une période de 24 heures. 124
Figure 87 : Effet des différents traitements sur la puissance des ondes cérébrales enregistrées par électroencéphalographie. 125
Figure 88 : Puissance de l'onde θ obtenue pendant les phases de REM lors de la troisième semaine post-injection. 125
Figure 89 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire. 126
Figure 90 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.....126
Figure 91 : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°5. 127
Figure 92 : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°5.....128
Figure 93 : Marquage de la protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée dans les différentes couches de l'hippocampe. 129
Figure 94 : Réaction gliale à proximité des lésions de type neurofibrillaire au niveau de la couche CA1. 129
Figure 95 : Effet du traitement Abeta-Tau sur la puissance des ondes cérébrales.....130
Figure 96 : Puissance de l'onde θ obtenue pendant les phases de REM lors de la première et de la dernière semaine d'enregistrement. 130
Figure 97 : Proportion des différents états de chaque groupe sur une période de 24 heures. 130
Figure 98 : Résultats du test d'évaluation de la mémoire. 131

Figure 99 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage. 131
Figure 100 : Effet de la scopolamine sur la puissance des ondes cérébrales ainsi que sur la proportion des différents états. 132
Figure 101 : Schéma hypothétique des interactions pouvant inhiber le REM et la génération de l'onde θ par l'hippocampe. 133
Figure 102 : Représentation hypothétique des effets de l'injection de l'AAV-Tau P301L ou du peptide Aβ42 au niveau de l'hippocampe. 136
Figure 103 : Représentation hypothétique de la synergie rencontrée entre le peptide Aβ42 et la protéine Tau mutée dans notre modèle animal de MA. 138

Liste des tableaux

Tableau 1 : Progression des différentes lésions et des signes cliniques de la MA. 25
Tableau 2 : Exemple d'études avec injection de peptide Aβ. 35
Tableau 3 : Liste non exhaustive des principales FAD portant sur des mutations du gène de l'APP. 36
Tableau 4 : Récapitulatif des principaux modèles de souris transgéniques. 42
Tableau 5 : Récapitulatif des différents modèles animaux de la MA. 47
Tableau 6 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des différents tests de mémoire. 60
Tableau 7 : Plan expérimental de l'étude préliminaire 70
Tableau 8 : Listes des différents anticorps utilisés dans l'étude préliminaire 75
Tableau 9 : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°1. 91
Tableau 10 : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°2. 102
Tableau 11 : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°3. 111
Tableau 12 : Listes des différents anticorps utilisés pour les analyses biochimiques. 113
Tableau 13 : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°5. 128

Liste des abréviations

- AA : Acide Aminé
- AAV : Adeno-Associated Virus
- Aβ : peptide bêta-amyloïde
- ActA : Active Avoidance
- AchE : Acétylcholine Estérase
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AICD : Amyloid precursor protein Intracellular Domain
- AMPA : α-Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoazol-4-Propionate
- AMPc : Adenosine Monophosphate cyclique
- AP : Antéro-Postérieur
- APP : Amyloid Precursor Protein
- ARNm : Acide Ribonucléique messager
- BACE : β-site APP Cleaving Enzyme
- BM : Barnes Maze
- CA : Corne d'Ammon
- CaMK : Calmoduline dependant Kinase
- CREB : C-AMP Response Element-Binding protein
- CTF : C Terminal Fragment
- DAMP : Danger Associated Molecular Pattern
- DNF : Dégénérescence Neurofibrillaire
- DSM IV : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
- EcoG : Electrocorticogramme
- EEG : Electroencéphalogramme
- ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ERP : Event-Related Potential
- FAD : Familial Alzheimer's Disease
- FTDP : Frontotemporal Dementia with Parkinsonism
- FC : Fear Conditionning
- GD : Gyrus Denté
- GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
- GSK : Glycogen Synthase Kinase
- H_2O_{UHQ} : eau Ultra Haute Qualité
- HRP : Horseradish Peroxidase
- Hz : Hertz
- ICV : Intra-Cérébro-Ventriculaire
- IDE : Insulin Degrading Enzyme
- Ig : Immunoglobuline
- IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
- kDa : kilo Dalton
- KI : Knock In

- KO : Knock Out
- L : Latéral
- LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
- LTD : Long Term Depression
- LTP : Long Term Potentiation
- MA : Maladie d'Alzheimer
- MAP : Microtubule Associated Protein
- MAPK : Microtubule Associated Protein Kinase
- MCI : Mild Cognitive Impairment
- MWM : Morris Water Maze
- NFT : Neurofibrillary Tangle
- NGF : Nerve Growth Factor
- NMDA : N-Methyl-D-Aspartate
- NOR : Novel Object Recognition
- NREM : Non-Rapid Eye Movement
- NT : Neuropil Thread
- OC : Operant Chamber
- PasA : Passive Avoidance
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- PET-Scan : Positron Emission Tomography
- PDGF : promoteur du gène Platelet-Derived Growth Factor
- PHF : Paired Helical Filament
- PRR : Pattern Recognition Receptor
- PS : Plaque Sénile
- PS1 : Presenilin 1
- PS2 : Presenilin 2
- PrP : Prion Protein
- qEEG : quantitative Electroencephalogram
- RAM : Radial Arm Maze
- RAWM : Radial Arm Water Maze
- REM : Rapid Eye Movement
- SAMP : Senescence-Accelerated Mouse Prone
- SNC : Système Nerveux Central
- Tau : Tubulin associated unit
- TBST : Tris-buffered saline/Tween
- TDP 43 : Transactive response DNA binding Protein 43 kDa
- TLR : Toll Like Receptor
- TM : T Maze
- vg : vector genome
- WB : Western-Blot
- wt : wild type
- YM : Y Maze

Avant propos

La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence dans le monde. Aucun traitement curatif n'est à ce jour disponible. Avec l'augmentation de l'incidence des cas, notamment liée au vieillissement de la population dans les pays développés, cette maladie est devenue un enjeu majeur de santé publique.

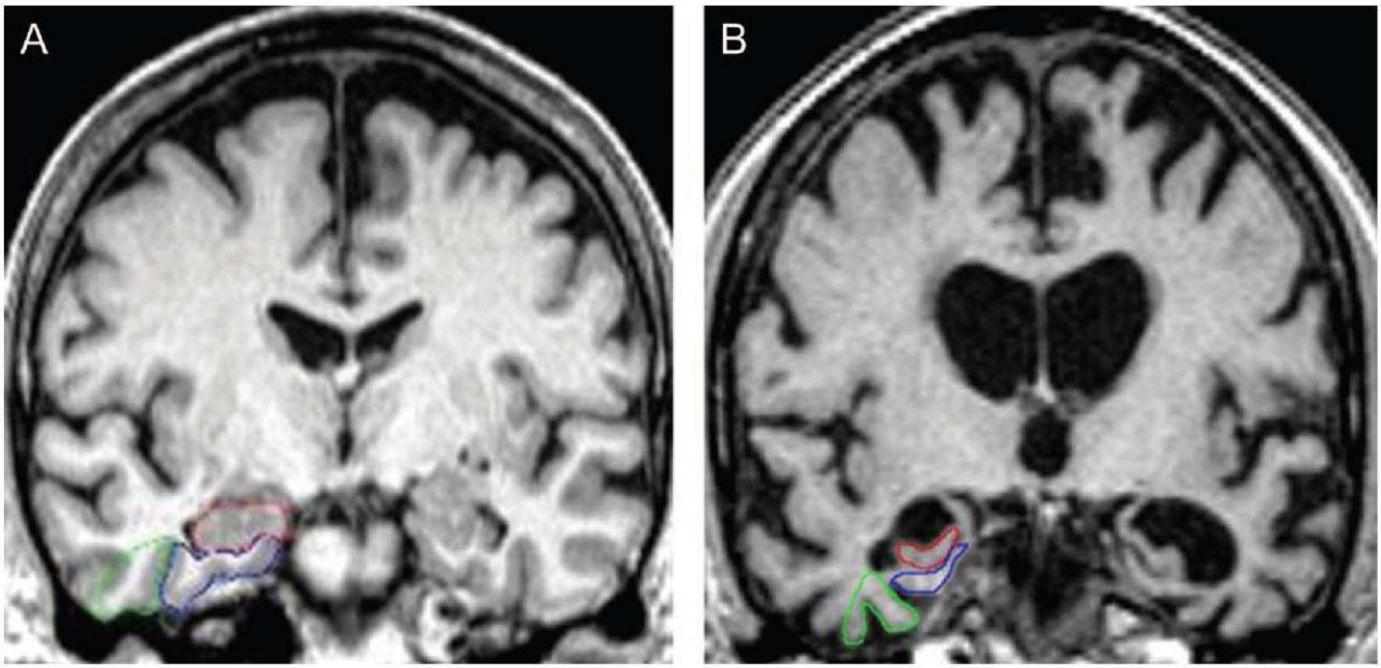
Les travaux présentés dans ce manuscrit font suite à une collaboration entre une équipe de recherche universitaire et un groupe industriel spécialisé dans le développement de médicaments dans le cadre de la recherche préclinique. Ils ont été réalisés avec à la volonté d'élaborer un nouveau modèle expérimental de la MA, destiné au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dirigées contre cette pathologie. De nombreux modèles animaux de la MA sont actuellement disponibles. Cependant, seuls des modèles de rongeurs transgéniques reproduisent les deux types de lésions histologiques caractéristiques de la MA, à savoir, les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire ; or ces modèles transgéniques présentent de nombreuses limites. L'objectif de ces travaux de recherche a donc été de développer et de caractériser un nouveau modèle animal non transgénique de la maladie d'Alzheimer, présentant les deux types de lésions caractéristiques, ainsi que les altérations de la mémoire qui leur sont associées.

Ce mémoire se divise en trois grandes parties. La première constitue une revue bibliographique des travaux majeurs qui ont été réalisés sur cette pathologie. Ce recueil est présenté en quatre chapitres suivant la démarche intellectuelle qui a été pratiquée pour la mise au point du modèle :

- Compréhension de la MA et de sa physiopathologie.
- Présentation de l'état de l'art concernant la modélisation de la MA en recherche préclinique.
- Choix d'un test d'évaluation de la mémoire adapté, parmi ceux disponibles.
- Est-t-il possible de caractériser un dysfonctionnement du système nerveux central (SNC) induit par des lésions de type Alzheimer, grâce à une analyse des ondes cérébrales ?

Les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse sont présentées dans la deuxième partie, sous la forme d'expériences individuelles visant chacune à caractériser un modèle de MA. Le choix final du modèle est présenté et discuté dans la troisième partie, en fonction des critères préalablement définis.

Partie 1 : Introduction et généralités



<u>Figure 1</u> : Atrophie du cerveau observée par IRM dans la MA

A, personne saine ; **B**, personne atteinte de la MA. La zone entourée en rouge correspond à l'hipocampe, en bleu au cortex entorhinal, et en vert au cortex périrhinal.
Source : Duara et al., 2008.

1. La maladie d'Alzheimer

1.1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer

Principales caractéristiques :

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par une neurodégénérescence progressive et irréversible du système nerveux central, se traduisant d'abord par des troubles de la mémoire et pouvant évoluer jusqu'à un stade de démence. Selon la définition de l'OMS : «La démence est un syndrome dans lequel on observe une dégradation de la mémoire, du raisonnement, du comportement et de l'aptitude à réaliser les activités quotidiennes ». Cette neurodégénérescence touche en particulier les fibres cholinergiques du cerveau. Elle est caractérisée par une atrophie du cerveau et un élargissement des ventricules cérébraux visibles par IRM (Duara et al., 2008 ; **figure 1**). Une des conséquences directes de cette pathologie, en plus de la perte d'autonomie des personnes atteintes, est une baisse de l'espérance de vie. Les patients atteints de MA présentent un taux de mortalité deux fois supérieur à une personne non malade du même âge (source : www.fondation-alzheimer.org).

Epidémiologie :

Dans le monde, 47,5 millions de personnes souffrent de démences et 7,7 millions de nouveaux cas sont établis chaque année. La MA est la cause principale de ces démences dans 60 à 70% des cas (source : www.who.int, chiffres de mars 2015 dans fact sheet N°362 concernant les démences)(Kremer et al., 2011). Dans les pays développés, la prévalence de cette maladie est de 5% des personnes âgées de plus de 65 ans, et de 30% des personnes âgées de plus de 85 ans (source : www.fondation-alzheimer.org). En France, 900 000 personnes seraient atteintes par la MA et des estimations prévoient une augmentation de cette prévalence à 1,3 millions de personnes touchées d'ici 2020. Ceci s'expliquerait notamment par l'augmentation de l'espérance de vie (source : www.inserm.fr).

Il existe des formes héréditaires de la MA qui se déclenchent généralement avant l'âge de 65 ans. Ces formes héréditaires, appelées formes familiales de la MA (ou FAD pour Familial Alzheimer's Disease) proviennent de mutations génétiques identifiées chez certaines familles dont les membres sont sujets à des formes précoces et sévères de la MA. Ces formes familiales représentent seulement 1,5 à 2% des cas de MA. Par opposition, les formes non héréditaires de la MA sont appelées formes sporadiques (source : www.inserm.fr).

Les principaux symptômes :

La MA se manifeste principalement par une perte progressive de la mémoire des faits récents et une difficulté à retenir de nouvelles informations. Ces troubles mnésiques sont également associés à au moins un des troubles cognitifs suivant (critère du DSM IV) :

- Aphasie (troubles du langage).
- Apraxie (difficulté à réaliser des tâches familières en l'absence de troubles moteurs).

- Agnosie (difficulté à reconnaître certains objets familiers voire des personnes proches en l'absence de troubles sensoriels).
- Troubles des fonctions exécutives (difficultés à réaliser certaines tâches cognitives tel que planifier, organiser dans le temps, résoudre des problèmes…).

Les patients atteints de MA présentent également des troubles de l'humeur qui se manifestent généralement par une désocialisation, une perte de motivation (apathie), et fréquemment de l'agressivité…

Le diagnostic :

Il s'établit par des tests cognitifs réalisés suite à des plaintes de troubles de mémoire souvent formulées par le patient. Un questionnement de l'entourage proche du patient sur des changements de son comportement peut être également réalisé. Un examen neurologique (évaluation d'une atrophie cérébrale en IRM) ainsi que la recherche de certains biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peuvent être réalisés afin de renforcer le diagnostic. Les biomarqueurs évalués dans le LCR obtenu par ponction lombaire, correspondent à des mesures de la concentration en peptide bêta-amyloïde, en protéine Tau totale et en protéine Tau phosphorylée. Des techniques de PET-scan (Positron Emission Tomography) sont actuellement en développement afin de rechercher par imagerie la présence de lésions cérébrales et de mesurer l'activité, via le métabolisme du glucose, des principales zones du cerveau touchées dans la MA (source : www.inserm.fr ; Jack et al., 2013). A ce jour, le seul examen permettant de poser avec certitude le diagnostic de MA, reste l'observation post-mortem des lésions histologiques du cerveau d'un patient (Jaworski et al., 2010).

Les traitements :

Actuellement, les seuls traitements disponibles agissent en rétablissant un équilibre de la concentration de certains neuromédiateurs qui sont altérés dans la MA. Il ne s'agit pas de traitements curatifs car ils n'agissent pas sur les mécanismes de la MA. Ils permettent, en revanche, d'améliorer les performances cognitives des patients. En France, quatre molécules sont disponibles (source : www.francealzheimer.org) : trois agissent sur la baisse d'acétylcholine qui est consécutive à la destruction des fibres cholinergiques (donépézil, galantamine et rivastigmine) et une agit sur l'accumulation de glutamate responsable d'une excitotoxicité (mémantine). Jusqu'à présent, les essais thérapeutiques visant à « corriger » les lésions rencontrées dans la MA ont tous rencontré des échecs lors de leur passage en phase clinique (pour revue : Franco and Cedazo-Minguez, 2014).

Les différents facteurs de risques ou facteurs protecteurs :

En dehors des formes familiales de la MA où des mutations génétiques sont responsables de l'apparition de cette pathologie, plusieurs facteurs de risques ont été identifiés. Le principal facteur de risque est l'âge. En effet, cette maladie est relativement rare avant l'âge de 65 ans, puis son incidence augmente de manière exponentielle avec l'âge. Il existe de nombreux autres facteurs de risques identifiés, comme par exemple :

- Le sexe : les femmes ont un risque plus élevé de développer la MA. Ce phénomène serait dépendant des facteurs hormonaux.
- Les risques cardiovasculaires liés à des troubles métaboliques tels que l'obésité, l'hypercholestérolémie et le diabète (Arvanitakis et al., 2004)(Craft, 2009).

<u>Figure 2</u> : Dessin original des neurofilaments observés par Aloïs Alzheimer (1906).

Source : Maurer et al., 1997.

- La dépression chronique, l'apathie, une vie sociale pauvre (Wilson et al., 2006)(Onyike et al., 2007).
- L'existence de plusieurs cas de MA dans une famille (en dehors des cas de FAD).
- Etre porteur de l'allèle ε4 du gène codant pour l'apolipoprotéine E (APOE) qui est un transporteur du cholestérol et qui participerait à l'élimination du peptide Aβ (Lai et al., 2006).

A l'inverse, il existe plusieurs facteurs protecteurs tels que le fait d'avoir une activité cognitive variée et intense ainsi qu'un haut niveau d'éducation. En effet, les activités cognitives participeraient à retarder l'apparition des signes cliniques par des phénomènes de compensation des lésions. C'est la notion de réserve cognitive (Stern, 2009). Un autre exemple de facteur protecteur est d'être porteur de l'allèle ε2 du gène codant pour l'apolipoprotéine E (source : www.alz.org).

1.2. Plus d'un siècle de recherche

1892 : Découverte des plaques séniles, une des lésions caractéristique de la MA, chez un patient épileptique par Blocq et Marinesco (source : Goedert et al., 2006).

1906 : Première description de la maladie réalisée par Alois Alzheimer (médecin allemand) suite à l'examen post-mortem du cerveau d'une femme de 51 ans atteinte de démence. A. Alzheimer décrit alors la présence de filaments anormaux au sein de neurones du cortex cérébral (**figure 2**) de la patiente qui présentait également des lésions de type plaque sénile (source : Maurer et al., 1997 ; Landreth and Reed-Geaghan, 2009).

1910 : Attribution du nom de maladie d'Alzheimer par le psychiatre allemand Emil Kreapelin (source : Puzzo et al., 2015).

1911 : La pathologie fibrillaire est observée une seconde fois par A. Alzheimer dans un deuxième cas de démence par la technique d'imprégnation argentique (source : Duyckaerts et al., 1999).

1927 : Coloration des plaques séniles au rouge Congo qui sont alors décrites par Divry comme composées de substance amyloïde. Ces plaques séniles étaient considérées jusqu'alors comme des zones de nécrose (source : Duyckaerts et al., 1999).

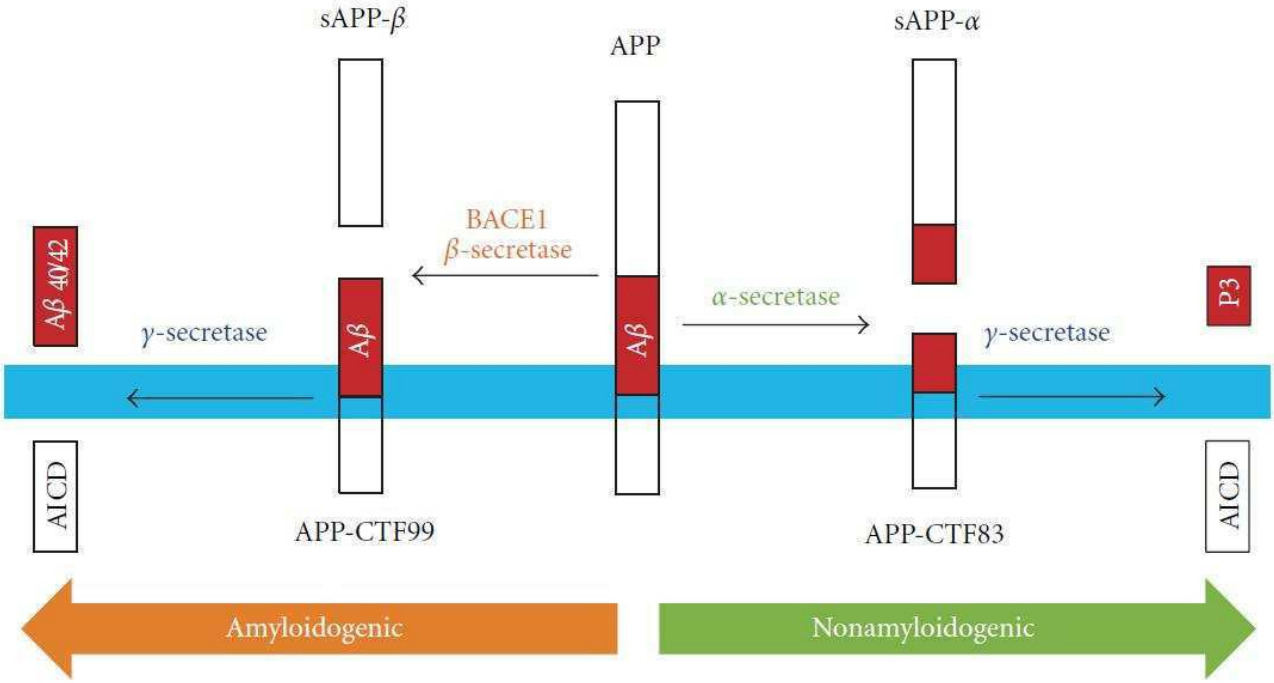
1961 : Première observation au microscope électronique des neuro-filaments pathologiques par Kidd et description de leur structure tridimensionnelle en paire de filaments hélicoïdaux (Kidd, 1963)(Kidd, 2006).

1980 : Description de la structure tridimensionnelle en feuillet β des substances amyloïdes par Glenner (Glenner, 1980).

1984 : Purification du peptide béta-amyloïde (Aβ) au sein de dépôts amyloïdes vasculaires (Glenner and Wong, 1984).

1985 : Identification de la protéine Tau par immunomarquage comme l'un des constituants des neuro-filaments pathologiques (Brion et al., 1985).

1991 : Création des premiers modèles de souris transgéniques de la MA (Quon et al., 1991)(Sandhu et al., 1991).



<u>Figure 3</u> : Schéma représentatif de la voie amyloïdogénique et de la voie non-amyloïdogénique.

La membrane plasmique est représentée en bleu et la région de la protéine APP corespondant au peptide Aβ est représentée en rouge.
Source : Wang et al., 2012.

1999 : Première tentative de vaccination dirigée contre le peptide Aβ, d'abord testée sur un modèle de souris transgéniques (Schenk et al., 1999), puis passage en phase clinique (AN-1792) en 2001 (source : www.alzforum.org).

2015 : Aucun traitement curatif disponible à ce jour.

1.3. Physiopathologie de la MA

1.3.1. Les différents acteurs de la maladie

Deux sortes de lésions histologiques sont retrouvées au niveau du cerveau des patients atteints de MA. Elles peuvent être observées lors d'examens post-mortem par microscopie. Il s'agit :

- des dépôts amyloïdes extracellulaires présents dans le parenchyme cérébral.
- des enchevêtrements de fibrilles intracellulaires retrouvés dans les neurones en dégénérescences.

Ces deux types de lésions peuvent être retrouvés à proximité l'une de l'autre et ainsi former les plaques séniles.

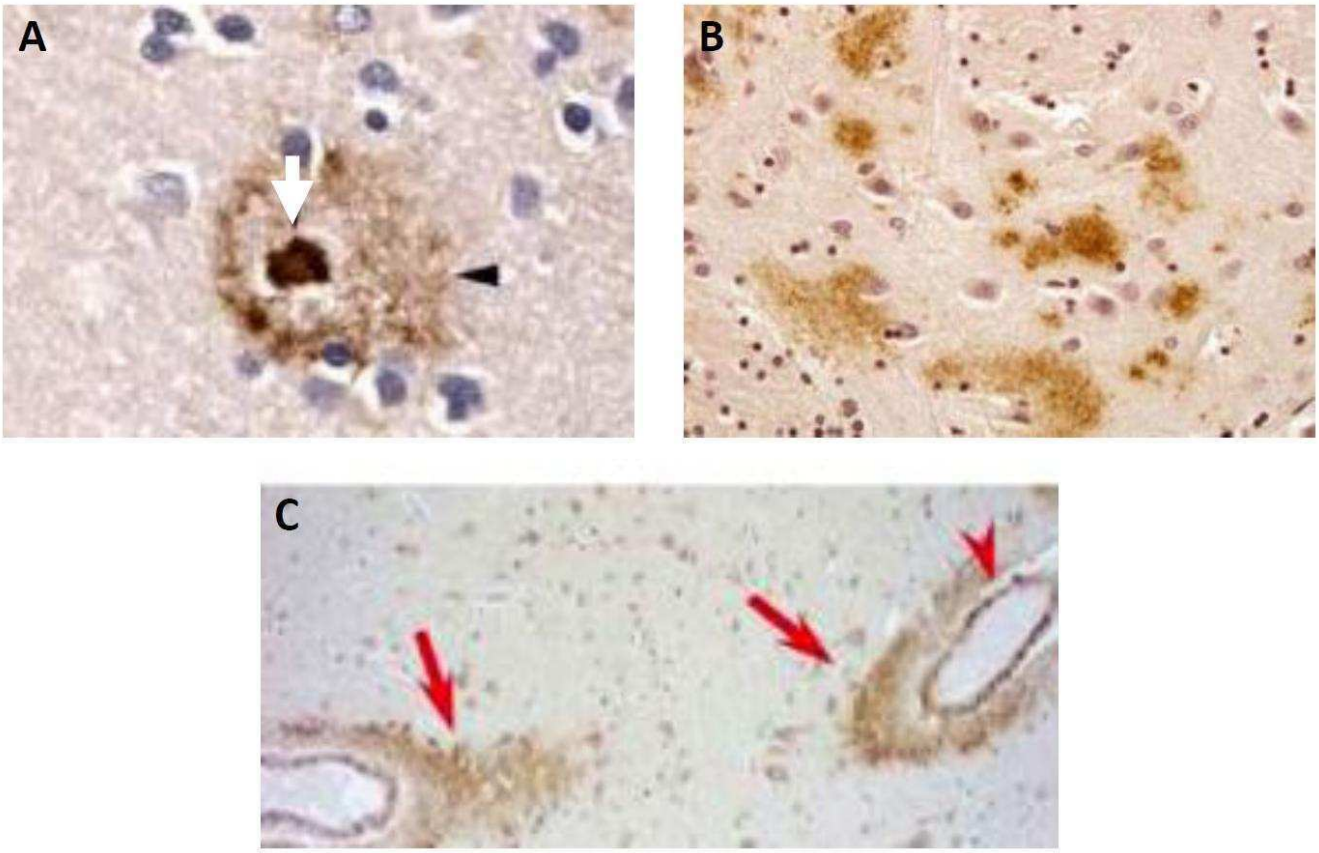
1.3.1.1. Les dépôts amyloïdes

Description **:**

Le terme de substance amyloïde fait référence à un dépôt fibrillaire composé d'éléments organisés en feuillet β et possédant la propriété de se colorer avec le marquage rouge Congo en donnant une biréfringence en lumière polarisée. Les dépôts amyloïdes observés dans la MA sont constitués de l'agrégation du peptide β amyloïde (peptide Aβ) composé généralement de 42 acides aminés (AA). Cette agrégation provient d'une concentration intracérébrale anormalement élevée de ce peptide rencontré dans la MA. L'accumulation du petide Aβ serait due à un déséquilibre entre la production de ce peptide et son élimination (Landreth and Reed-Geaghan, 2009)(Carty et al., 2013).

Le peptide Aβ provient du clivage de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) (Delacourte et al., 2002). Il existe plusieurs isoformes de cette protéine, présente dans l'ensemble des tissus de l'organisme, allant de 365 à 770 AA (Puzzo et al., 2015). Dans les neurones, huit isoformes d'APP sont retrouvées (de 670 à 770 AA), la forme 695 AA étant la principale (Bayer and Wirths, 2010). Cette protéine est clivée suivant deux voies distinctes : la voie amyloïdogènique conduisant à la sécrétion du peptide Aβ et la voie non-amyloïdogénique. Ces deux voies sont physiologiques, mais l'accumulation de peptide Aβ pourrait être liée à un déséquilibre de ces voies en faveur de la voie amyloïdogènique. Le clivage de l'APP est effectué par différentes enzymes membranaires de type sécrétases en fonction de la voie empruntée (Puzzo et al., 2015)(Wang et al., 2012 ; **figure 3**) :

- Voie non-amyloïdogénique :
  - APP clivée par l'α sécrétase donnant une partie N-terminale sécrétée : sAPPα, et une partie C-terminale transmembranaire : CTF83 (C Terminal Fragment) de 83 AA.



<u>Figure 4</u> : Les trois lésions histologiques de type amyloïde.

Immuomarquages du peptide Aβ réalisés sur des coupes de cerveaux de patients atteints de MA.
A : Dépôt focal (fléche blanche) entouré d'un halo diffus de petide Aβ (fléche noire). Source : Duyckaerts et al., 2009.
B : Dépôts diffus de peptide Aβ. Source : Duyckaerts et al., 2009.
C : Dépots vasculaires (fléches rouge) observés en périphierie de vaisseux sanguins (pointe de fléche). Source : Andrea and Nagele, 2010.

- CTF83 clivé par la γ sécrétase donnant le fragment P3 (N-terminal) sécrété et un fragment C-terminal intracellulaire (AICD) de 57 à 59 AA.

➢ Voie amyloïdogénique :
- APP clivée par la β sécrétase (également appelé BACE) donnant une partie N-terminale sécrété : sAPPβ, et une partie C-terminale transmembranaire : CTF99 (C Terminal Fragment) de 99 AA.
- CTF99 clivé par la γ sécrétase donnant le peptide Aβ de 40 ou 42 AA (N-terminal) sécrété et un fragment C-terminale intracellulaire (AICD).

L'accumulation de peptide Aβ dans le cerveau pourrait également être liée à un défaut d'élimination. Le peptide Aβ sécrété par la voie amyloïdogénique est dégradé par plusieurs métalloprotéases. La principale enzyme dégradant Aβ est la Néprilysine (Grimm et al., 2015). L'inhibition de cette protéine dans des modèles de souris transgéniques exprimant la protéine APP humaine entraine une augmentation de leur charge amyloïde intracérébrale (Marr et al., 2004), alors que sa surproduction protège du déclin cognitif rencontré chez ces souris (Park et al., 2013). Une autre enzyme est associée à un défaut d'élimination du peptide Aβ dans la littérature. Il s'agit de l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE). La baisse de l'expression de cette enzyme serait associée à une accumulation de peptide Aβ retrouvé chez des patients présentant une insulino-résistance au niveau du cerveau. D'après Correia (Correia et al., 2011), cette insulino-résistance pourrait-être à la base du déclenchement d'une MA sporadique.

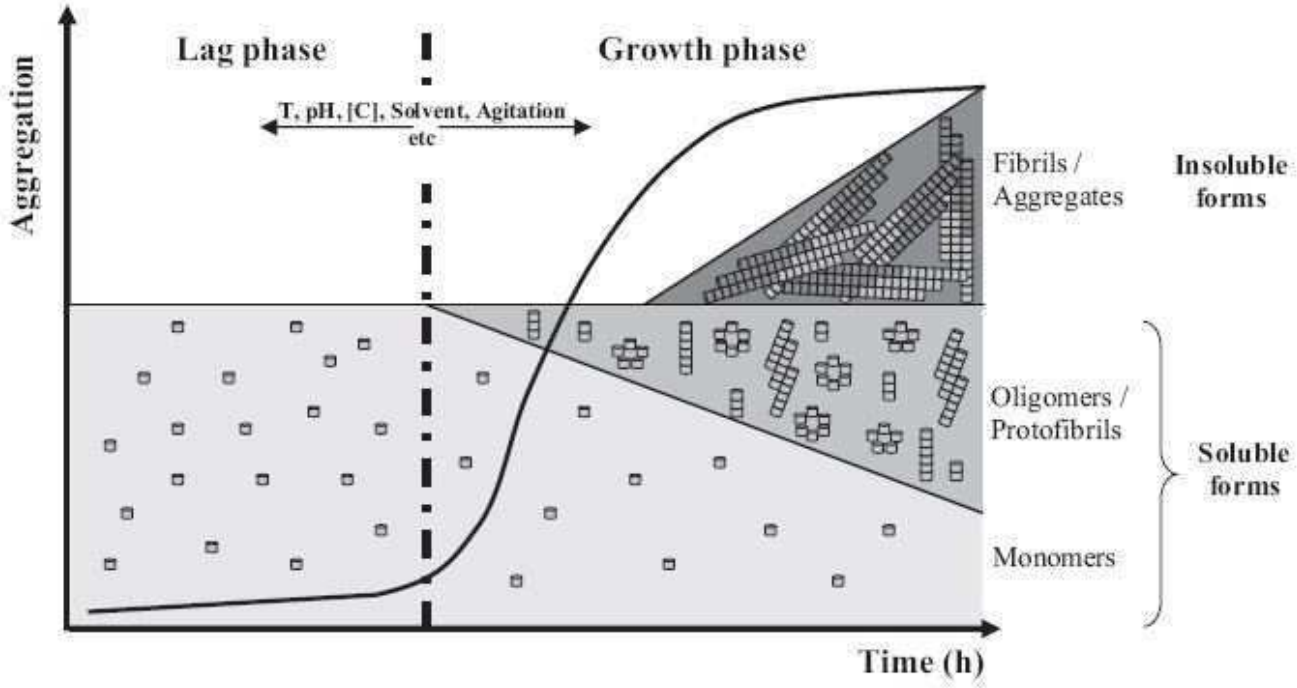
Les trois lésions histologiques de type amyloïdes (**figure 4**) :

Lors de l'examen post-mortem de cerveaux de patients atteints de la MA, les lésions histologiques liées à l'accumulation et l'agrégation du peptide Aβ sont de trois formes (Duyckaerts and Hauw, 1997)(Duyckaerts et al., 2009)(Andrea and Nagele, 2010) :

- Les dépôts denses focaux correspondant au noyau des plaques séniles. Ils sont de forme sphérique avec un diamètre de 10 à 20 nm.
- Les dépôts amyloïdes diffus. Ils sont plus volumineux et de forme irrégulière et ne sont jamais associés à une couronne de neurites dystrophiques contrairement aux noyaux denses des plaques séniles (voir chapitre 1.3.1.3).
- Les dépôts amyloïdes vasculaires responsables d'angiopathies cérébrales dans la MA.

Différentes formes de peptide Aβ **:**

Deux formes majeures de peptide sont sécrétées : la forme de 42 AA (Aβ42) et la forme de 40 AA (Aβ40) (Landreth and Reed-Geaghan, 2009). En conditions physiologiques, le peptide Aβ42 ne représente que 10 à 15% de peptides sécrétés (Younkin, 1998). Mais, une augmentation du ratio de peptide Aβ42 / Aβ40 est constatée dans les formes héréditaires de la MA (FAD) et serait à l'origine des dépôts amyloïdes, la forme Aβ42 étant plus amyloïdogénique que l'Aβ40 (Barrow et al., 1992). L'ensemble des mutations identifiées conduisent toutes à un déséquilibre de la production des deux formes du peptide Aβ par la γ sécrétase, en faveur du peptide Aβ42 (Bayer and Wirths, 2010).



<u>Figure 5</u> : Représentation schématique de l'agrégation du peptide Aβ.

L'agrégation se fait suivant deux phases : une phase sans agrégation où le peptide reste sous forme monomérique (lag phase), puis une phase d'oligomériستaion (growth phase). Le temps nécessaire pour passer d'une phase à l'autre dépend de plusieurs facteurs : la température (T), le pH, la concentration en sels [C], le solvant, l'agitation…

Source : Chambon et al., 2011.

Les mutations identifiées dans les formes héréditaires de la MA sont retrouvées soit au niveau du gène de l'APP (chromosome 21), soit au niveau des gènes codant pour l'une des deux sous-unités possédant l'activité catalytique de la γ sécrétase : la préséniline 1 (chromosome 14) et 2 (chromosome 1).

Les dépôts amyloïdes sont constitués principalement de ces deux formes de peptide Aβ (40 et 42). Ces deux peptides sont donc retrouvés sous forme plus ou moins agrégées. Ils sont d'abord sécrétés sous forme soluble monomérique, puis s'agrègent sous forme de petits oligomères solubles (2 à 12 peptides) puis sous forme de filaments insolubles (**figure 5**) donnant les dépôts amyloïdes extracellulaires (Koffie et al., 2011). Il existe également un équilibre au sein des dépôts amyloïdes entre les formes insolubles situées au centre et les formes solubles situées en périphérie (Koffie et al., 2009). Chez des patients atteints de MA, les oligomères solubles de peptide Aβ40 sont généralement plus petits (Aβ40 souvent monomérique ou dimérique) que les oligomères formés par le peptide Aβ42 (dimérique à dodécamérique). De plus, le peptide Aβ40 est retrouvé sous forme agrégée dans des dépôts amyloïdes insolubles seulement à des stades avancés de la MA contrairement au peptide Aβ42, ce qui fait d'une surcharge en peptide Aβ42, un meilleur marqueur de la MA d'après Delacourte (Delacourte et al., 2002). Lors d'étude d'agrégation réalisée *in vitro*, le peptide Aβ40 présente également une capacité d'agrégation dépendante de sa concentration comme le peptide Aβ42, mais il forme moins d'agrégat et une large fraction de ce peptide reste sous forme monomérique (Dahlgren et al., 2002).

Il existe un débat sur le niveau de toxicité de ces différentes formes de peptide Aβ. Globalement, les formes monomériques sont considérées comme physiologiques et non toxiques (Granic et al., 2010). En revanche, les formes constituées d'un plus grand nombre de peptides sont le reflet d'une surcharge amyloïde pathologique. La toxicité des dépôts amyloïdes a été la première étudiée. Mais il existe désormais de nombreuses études démontrant que les formes oligomériques solubles seraient plus toxiques que les agrégats insolubles. Par exemple, lors d'études in vitro, un apport de peptide Aβ oligomérique soluble entraine une diminution de la viabilité cellulaire 10 fois plus marquée qu'avec une forme insoluble et 40 fois plus marquée qu'avec la forme monomérique (Dahlgren et al., 2002)(Chambon et al., 2011). La forme oligomérique soluble possède également une forte affinité pour les synapses, entrainant une diminution des phénomènes de plasticité synaptique de manière plus importante que les agrégats de peptide Aβ (Stéphan and Phillips, 2005). Un autre élément laisse penser que les formes solubles sont plus délétères que les formes fibrillaires : il existe des cas de MA sévères chez des patients présentant peu de dépôts amyloïdes (McKee et al., 1991)(Terry et al., 1991) et l'ensemble des thérapies tournées contre les agrégats de peptide amyloïde n'ont pas donné de résultats positifs dans le traitement de la MA, malgré une diminution de ces plaques (Holmes et al., 2008). En revanche, les plaques amyloïdes sont associés à une réaction inflammatoire chronique pouvant être délétère pour les neurones (Stéphan and Phillips, 2005).

D'après certains auteurs, une forme particulière d'Aβ soluble serait la plus délétère et la mieux corrélée avec l'apparition des premiers troubles cognitifs. Il s'agit de la forme dodécamérique de 56 kDa appelée Aβ*56 découverte grâce aux modèles transgéniques de la MA (Lesné et al., 2006)(Akiyama et al., 2012). De la même manière, la toxicité dépend également de la taille du peptide (40 ou 42 AA), le forme de 40 AA semblant produire moins d'effet sur la viabilité cellulaire (Dahlgren et al., 2002) ainsi que moins d'effet sur la plasticité synaptique que la forme de 42 AA (Chambon et al., 2011), à concentrations équivalentes.

Plus récemment, des formes de peptide Aβ N-tronquées ont été identifiées au sein des dépôts amyloïdes de patients atteints de la MA (Oberstein et al., 2015) et chez des souris transgéniques développant ces dépôts(Casas et al., 2004). Mais l'origine et la contribution de ces formes de peptide Aβ sont encore mal connues.

Neurotoxicité du peptide Aβ :

La toxicité induite par le peptide Aβ est encore mal comprise. Certains auteurs décrivent des phénomènes de toxicité via une interaction directe avec la cellule, une inflammation chronique ou des problèmes vasculaires. Une synaptotoxicité induite par les formes solubles est également bien décrite.

- Toxicité par interaction directe

Des phénomènes d'apoptoses ont été décrits sur des cellules en culture. La voie apoptotique pourrait être activée, par une interaction directe entre le peptide Aβ et les récepteurs TLR4 (Toll Like Receptor) (Tang et al., 2008). Ces récepteurs font partie de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptor) intervenant dans l'immunité innée et pouvant déclencher une mort par apoptose en cas de reconnaissance d'un signal de danger (DAMP : Danger Associated Molecular Pattern). Cette mort cellulaire pourrait également être liée à un afflux massif de calcium intracellulaire provoqué par le peptide Aβ via une interaction directe avec les récepteurs canaux AMPA (Blanchard et al., 2004), ou par l'inhibition de la recapture du neurotransmetteur glutamate par les astrocytes (Harkany et al., 2000). L'accumulation de glutamate dans la fente synaptique induit une sur-activation de ses récepteurs : AMPA et NMDA, et ainsi le passage massif de calcium dans les neurones. Les phénomènes de toxicité induits par une sur-activation de voies excitatrices sont appelés phénomènes d'excitotoxicités. Un des traitements disponibles de la MA vise à réduire cette excitotoxicité par abaissement de la concentration en glutamate : il s'agit de la mémantine.

Une autre piste étudiée provient de l'observation faite sur certains modèles transgéniques développant une forte perte neuronale et un déclin cognitif suite à une accumulation de peptide Aβ42 intracellulaire, avant toute formation de dépôts extracellulaires (Oakley et al., 2006)(Knobloch et al., 2007a). Cette accumulation de peptide est également retrouvée chez les patients atteints de la MA avec une augmentation du ratio Aβ42 / Aβ40 intraneuronal (Aoki et al., 2008)(Gouras et al., 2000). Il a été montré que le peptide Aβ peut être internalisé soit par endocytose, suite à sa liaison avec différents récepteurs comme les α7 nicotiniques (Nagele et al., 2002) ou les récepteurs NMDA (Bi et al., 2002), soit par phagocytose par des macrophages comme les cellules microgliales, ou soit par diffusion passive (Li et al., 2007). Malgré l'accumulation des preuves d'une augmentation de peptide Aβ intracellulaire dans la MA et la toxicité induite par cette internalisation, les phénomènes conduisant à cette toxicité sont encore mal connus, d'autant plus que le peptide Aβ intracellulaire est retrouvé à l'état physiologique (Wegiel et al., 2007). Néanmoins, d'après Caspersen (Caspersen et al., 2005), le peptide Aβ intracellulaire pourrait agir directement sur les mitochondries en dérégulant la chaine respiratoire et entrainant ainsi le relargage de dérivés oxygénés.

- Par inflammation

Les dépôts amyloïdes extracellulaires sont associés à une réaction inflammatoire chronique impliquant une activation des cellules astrogliales et microgliales (Jaworski et al., 2010)(Ryu and McLarnon, 2008). Les cellules microgliales migrent vers les lésions et entourent les dépôts amyloïdes (Landreth and Reed-Geaghan, 2009). Elles participent à l'élimination des dépôts par phagocytose du peptide Aβ (Rogers et al., 2007). Les astrocytes sont, quant à eux, retrouvés sous forme réactive (ou activée) à proximité des dépôts mais aussi dans l'ensemble du cerveau, même à distance des lésions. Ils expriment alors, sur des cerveaux de patients atteints de la MA, un niveau de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, marqueur de l'activation des astrocytes) jusqu'à 11 fois supérieur à celui observé chez des sujets témoins (Delacourte, 1990). Cette réaction gliale se traduit par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFα…) et de chimiokines qui induisent le recrutement de cellules inflammatoires telles que les cellules microgliales. Cette réaction est également associée à un relargage de dérivés oxygénés (Rogers et al., 2007)(Stéphan and Phillips, 2005)(Cho et al., 2011). Si ces phénomènes inflammatoires participent à l'élimination du peptide Aβ dans un premier temps, ils deviendraient délétères en chronique, induisant une toxicité sur les neurones notamment via les dérivés oxygénés et via une activation de la voie amyloïdogènique (Hickman et al., 2008). Par exemple, il a été constaté que des effets délétères sur la mémoire induits par une injection de peptide Aβ chez le rat, pouvaient être bloqués par un traitement anti-inflammatoire (Richardson et al., 2002). De plus, des études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence un effet protecteur de la prise régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le cadre d'un traitement de la polyarthrite rhumatoïde chronique (McGeer et al., 2006).

Une interaction directe entre le peptide Aβ et les cellules microgliales a notamment été décrite via les récepteurs TLR4 contribuant au déclenchement de la réaction inflammatoire (immunité innée). En effet, les formes oligomériques solubles ou fibrillaires du peptide Aβ seraient reconnues comme un signal de danger par les cellules via les PRR (Salminen et al., 2009). Une interaction de ces formes polypeptidiques avec le co-récepteur CD14 des TLR4 a, par exemple, été décrite avec une affinité 20 fois supérieure pour la forme fibrillaire par rapport à la forme soluble (Fassbender et al., 2004). Il a également été constaté une augmentation de l'expression du récepteur TLR4 et de son co-récepteur (CD14) à proximité des plaques séniles chez les patients atteints de la MA (Landreth and Reed-Geaghan, 2009).

- Vasculaire

La MA est souvent associée à une angiopathie amyloïde vasculaire (Shi et al., 2000)(Pansari et al., 2002)(la Torre, 2002). Des dépôts de peptide Aβ sont retrouvés au niveau de petits vaisseaux cérébraux, conduisant à des lésions de leur paroi et pouvant aller jusqu'à des hémorragies (Fossati et al., 2012). Il a été constaté, sur des études *in vitro*, que le peptide Aβ entraine une mort par apoptose des cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, ainsi qu'une inhibition de l'angiogenèse (Fossati et al., 2012)(Paris et al., 2004). La forme Aβ40 est décrite comme la plus vasoactive et la plus présente dans ces dépôts vasculaires (Hu et al., 2008)(Kumar-Singh, 2008).

D'après la Torre et Stefano (la Torre and Stefano, 2000), cette atteinte des vaisseaux pourrait conduire à une ischémie de certaines zones du cerveau, induisant ainsi une diminution du métabolisme de ces régions. Ce phénomène pourrait alors contribuer au déclin cognitif observé dans la maladie et à une amplification de la neurodégénérescence. Ces lésions sont également associées à une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) normalement assurée par les astrocytes. Cette rupture est observée avec le passage de grosses protéines du sang vers le cerveau dans des modèles d'injection intracérébrale de peptide Aβ chez le rongeur (Ryu and McLarnon, 2008). La BHE joue également un rôle dans l'élimination du peptide Aβ en assurant son transfert du parenchyme cérébral au sang. Or, cette rupture pourrait contribuer à un arrêt de ce transfert et donc au déséquilibre de la balance production / élimination du peptide (Sagare et al., 2013).

- Synaptotoxique :

Une diminution de la concentration en synaptophysine, une protéine constituant des vésicules synaptiques et considérée comme marqueur des synapses, a été constatée en particulier au niveau de l'hippocampe, chez les patients atteints de la MA (Bayer and Wirths, 2010). Cette diminution est attribuée à une perte de synapses dans cette région. Il a été démontré, par des études *in vitro* de formation de la mémoire (voir chapitre 3), que le peptide Aβ sous sa forme oligomérique soluble est capable d'inhiber les phénomènes de plasticité synaptique considérés comme à la base de la mémorisation (Lambert et al., 1998)(Stéphan and Phillips, 2005). Cette inhibition proviendrait d'un blocage de la recapture du glutamate, conduisant à une accumulation de calcium intracellulaire puis à une diminution de la densité des récepteurs membranaires au NMDA (Lacor et al., 2007)(De Felice et al., 2007), le même type de phénomène pouvant également être induit par un inhibiteur de la recapture du glutamate (Li et al., 2009). La forme de 42 AA apparaît comme plus efficace dans l'inhibition de cette plasticité que la forme de 40 AA (Nomura et al., 2012). Cet effet proviendrait d'interactions extracellulaires car, même si des études ont montré qu'une augmentation intracellulaire du peptide pouvait agir sur ce phénomène (Knobloch et al., 2007a), l'utilisation d'anticorps ciblant le peptide Aβ permet de rétablir la plasticité synaptique (Knobloch et al., 2007b).

Lors d'une étude réalisée sur des souris transgéniques produisant des dépôts amyloïdes, Koffie (Koffie et al., 2009) a constaté une diminution de la taille des épines dendritiques et de la densité en récepteurs NMDA dans des zones situées en périphérie des dépôts denses de peptides Aβ, où il se forme un « halo » de peptides moins agrégés voire solubles. Il a également observé, que des petits agrégats de peptide Aβ se formaient spécifiquement au niveau des synapses. Ce phénomène apparaît également à une certaine distance du « halo » d'agrégats de peptides Aβ, ce qui, d'après l'auteur, tend à prouver que cette toxicité synaptique est liée à des formes solubles du peptide Aβ et qu'il existe un gradient de concentration de ce peptide autour des dépôts amyloïdes.

Cette propriété synaptotoxique des formes solubles du peptide Aβ pourrait-être à l'origine des premiers troubles de la mémoire (Platt et al., 2011). Il pourrait également expliquer le fait que des thérapies visant à réduire la formation de dépôts amyloïdes n'ont pas montré d'effets bénéfiques sur le déclin cognitif chez des patients atteints de MA.

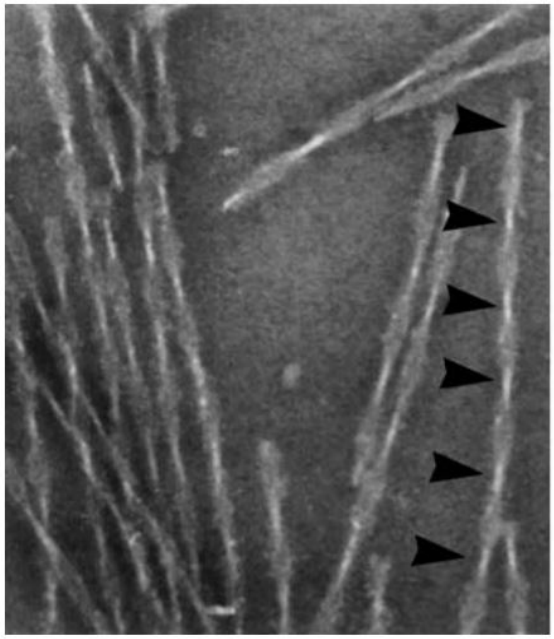
Rôle physiologique de l'APP et du peptide Aβ :

La protéine APP est retrouvée chez toutes les espèces animales et dans tous les types cellulaires. Son rôle reste néanmoins mal connu (Delacourte and Buée, 2005). Des études réalisées sur des souris transgéniques APP KO (Knock Out) ont permis de démontrer que cette protéine membranaire intervenait dans la transmission et la plasticité synaptique (Jedlicka et al., 2012)(Korte et al., 2012)(Dawson et al., 1999)(Ring et al., 2007). Une diminution des performances mnésiques est également observée chez plusieurs espèces animales, lors d'un blocage de cette protéine par une injection d'anticorps anti-APP et qui peut être rétabli par une injection d'un analogue de cette protéine (Mileusnic et al., 2005)(Doyle et al., 1990). Le rôle des métabolites issus du clivage de l'APP est aussi mal compris. Or, dans la MA, il est observé une baisse de certains de ces fragments, ce qui pourrait induire la perte de certaines fonctions (Delacourte and Buée, 2005). Ces différents métabolites posséderaient des propriétés neurotrophiques(Ma et al., 2007)(Leissring et al., 2002)(Gao and Pimplikar, 2001). Par exemple, chez la souris possédant un déficit de l'enzyme β sécérétase (souris BACE KO), il a été montré que ces métabolites contribuaient au développement de certaines structures du cerveau comme le bulbe olfactif (Rajapaksha et al., 2011). D'après Belyaev, les métabolites intracellulaires (AICD) interviendraient également dans l'accumulation du peptide Aβ, via la régulation de l'expression du gène codant pour la néprylisine : enzyme de dégradation du peptide Aβ (Belyaev et al., 2009).

Le peptide Aβ (40 et 42) est sécrété en faible dose (de l'ordre du picomolaire) de manière physiologique (Giedraitis et al., 2007). Cette concentration augmente seulement en conditions pathologiques. Ces effets sont dose dépendant. Certains auteurs lui attribuent des effets bénéfiques à concentration physiologique, notamment sur la mémoire, alors qu'à plus forte concentration, ces effets deviennent délétères. Certains auteurs qualifient alors ce peptide de « Dr Jekyll et Mr Hyde » (Puzzo and Arancio, 2013). En effet, il a ainsi été montré que le peptide Aβ, à faible dose (ou sous forme monomérique), peut faciliter les phénomènes de plasticité synaptique en stimulant la sécrétion de glutamate (Puzzo et al., 2011)(Abramov et al., 2009)(Mura et al., 2012). De plus, une injection d'anticorps anti-Aβ produit une diminution des performances lors de tests de mémoire qui est réversible par une injection de peptide Aβ (Garcia-Osta and Alberini, 2009). Une action neurotophique lui est aussi attribuée car, par exemple, l'inhibition des γ et β sécrétase induit une mort cellulaire (*in vitro*) qui peut être évitée par l'adjonction d'une faible dose de peptide Aβ (Plant et al., 2003). En revanche, à plus forte dose (de l'ordre du nanomolaire et/ou sous forme oligomérique), le peptide Aβ inhibe la plasticité synaptique et devient neurotoxique.

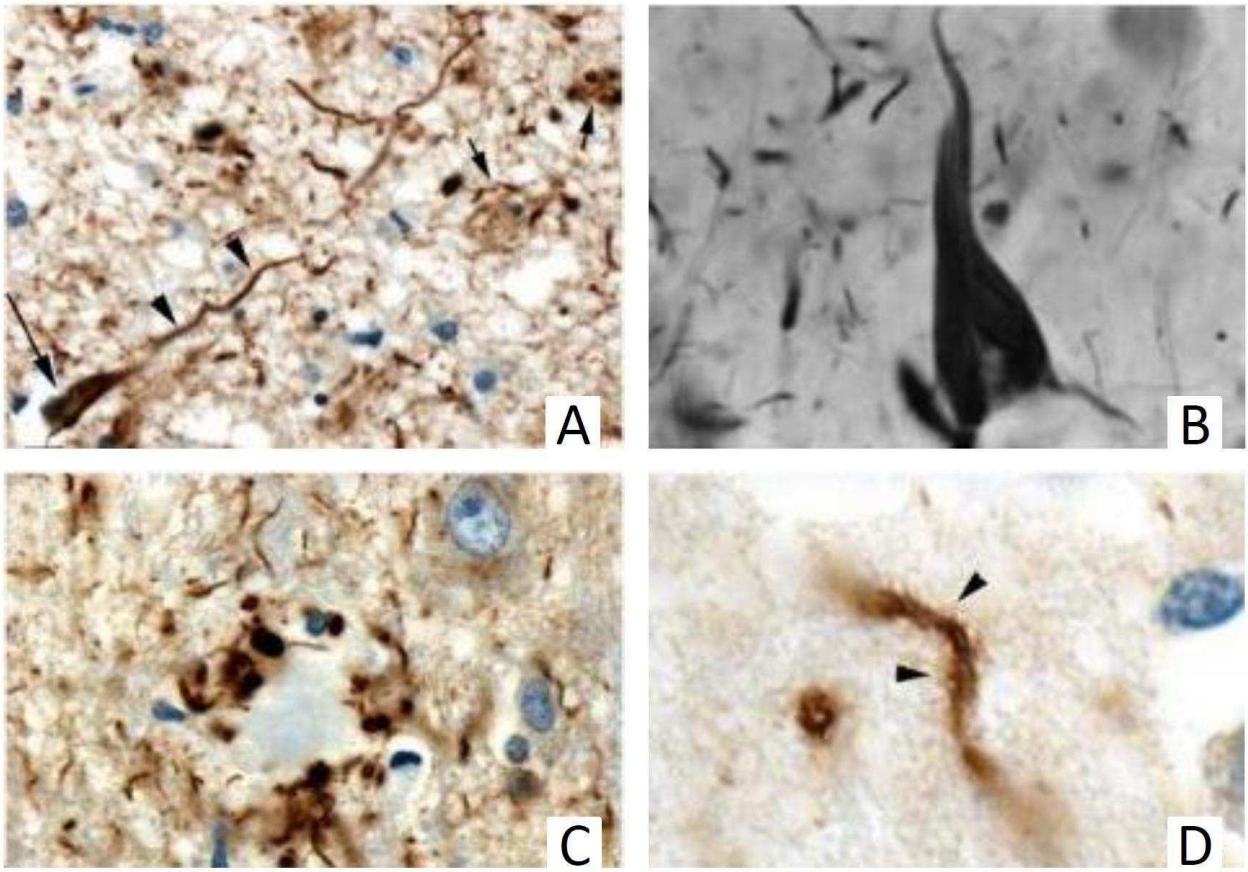
Le dépôt amyloïde : une lésion spécifique de la MA ?

Les dépôts amyloïdes ne sont pas uniquement retrouvés dans la maladie d'Alzheimer. Ils peuvent apparaître dans le cortex cérébral chez des sujets âgés sans pour autant présenter les signes cliniques de la MA (Duyckaerts et al., 1999)(Kovacs et al., 2013)(Sperling et al., 2011). Ces dépôts sont aussi retrouvés dans d'autres maladies comme les angiopathies amyloïdes cérébrales (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006), chez les personnes atteintes du syndrome de Down ou trisomie 21 (Mrak and Griffin, 2004), ou encore après un traumatisme crânien (Duyckaerts et al., 1999).



<u>Figure 6</u> : Structure en PHF de la protéine Tau.

Image obtenue par microscopie électronique à transmission, à partir de tissus provenant d'extraits de cerveaux de patients atteints de MA. Les fléches noires, éspacées d'environ 80 nm, indiquent la périodicité de l'hélice. Source : Mandelkow and Mandelkow, 2012.



<u>Figure 7</u> : Les quatre lésions histologiques de type DNF.

A : Enchevêtrement neurofibrillaire (NFT) en forme de « flamme » typique des neurones pyramidaux (fléche). La protéine Tau est également retrouvée accumulée au niveau des prolongements dendritiques (pointes de fléche). Des enchevêtrements fantômes sont également observés (petites fléches).
B : Enchevêtrement neurofibrillaire observé dans une cellule pyramidale au microscope optique.
C : Couronne de neurites dystrophiques.
D : Fibre tortueuse (pointes de fléche).
A, **C** et **D** : Protéine Tau immunomarquée. Source : Duyckaerts et al., 2009.
B : Source : Anderton, 1997.

1.3.1.2. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

Description :

Le second type de lésions retrouvées dans les cerveaux de patients atteints de MA sont les dégénérescences neurofibrillaires. Elles correspondent à une accumulation de fibrilles retrouvées dans le cytoplasme des neurones (Buée and Delacourte, 2006). Ces fibrilles, appelés enchevêtrements neurofibrillaires ou Neurofibrillary Tangles (NFT) en anglais, sont des structures insolubles (Brion, 2006) et argyrophile, c'est-à-dire visibles par des techniques d'imprégnation argentique comme le marquage Gallyas (Duyckaerts et al., 1999). Cette neurodégénérescence est rétrograde, c'est-à-dire que la formation des fibrilles débute dans les terminaisons nerveuses puis s'étend jusqu'en périphérie du noyau (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006). Ces neurofibrilles sont composées majoritairement d'un agrégat de protéine Tau (Tubulin-associated unit) anormalement phosphorylée et organisée en paire de filaments hélicoïdaux ou paired helical filaments (PHF) en anglais (**figure 6**). Le nom de double hélice n'est pas utilisé pour cette structure car elle est différente de celle de l'ADN (Kidd, 2006).

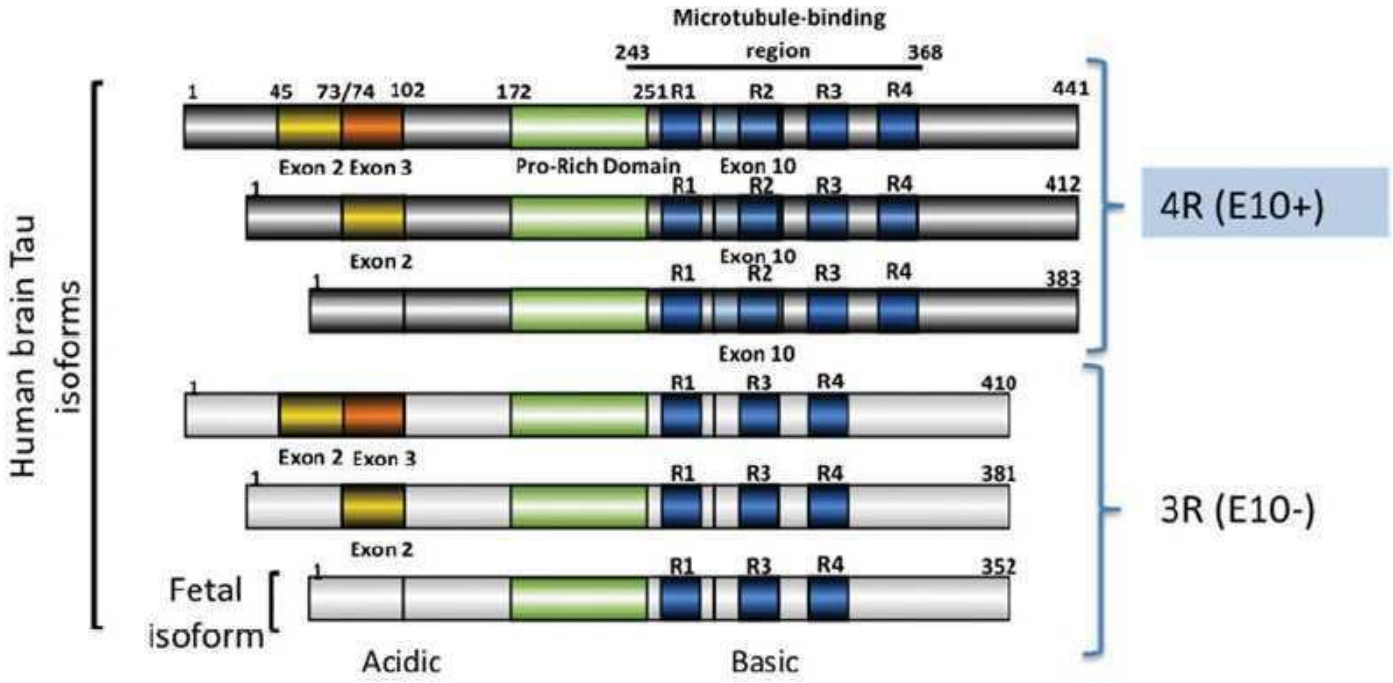
Les quatre lésions histologiques de type DNF (**figure 7**) :

Il existe quatre types de lésions présentant des PHF de Tau (Buée and Delacourte, 2006) observées dans les cerveaux de patients atteints de MA. Ces différentes lésions dépendent de l'état d'avancement des fibrilles de Tau au sein d'un neurone et de leur proximité avec les dépôts amyloïdes. Ces lésions sont les suivantes (Duyckaerts and Hauw, 1997)(Anderton, 1997)(Braak and Braak, 1991) :

- Les fibres tortueuses ou Neuropil Threads (NT). Elles correspondent à des dendrites dystrophiques présentes dans le neuropile (espace entre les neurones) et pouvant être détachées du corps des neurones (**figure 7 D**).
- Les enchevêtrements neurofibrillaires ou Neurofibrillary Tangles (NFT). Elles correspondent aux neurones en DNF c'est-à-dire avec une accumulation d'agrégats de protéine Tau organisées en PHF, retrouvés dans le corps des neurones et en périphérie du noyau (**figure 7 A et B**).
- Les enchevêtrements fantômes ou Ghost Tangles. C'est le stade ultime de la dégénérescence neurofibrillaire. Ils correspondent à des fibrilles de Tau extracellulaires observées après la mort du neurone. Ils laissent une « trace » du neurone d'où le terme de « fantômes » (**figure 7 A**).
- La couronne de neurites dystrophiques observée en périphérie des dépôts denses de peptide amyloïde. Ces neurites correspondent à des terminaisons nerveuses incluant les dendrites et les axones et présentant une forme et une taille anormale (**figure 7 C**).

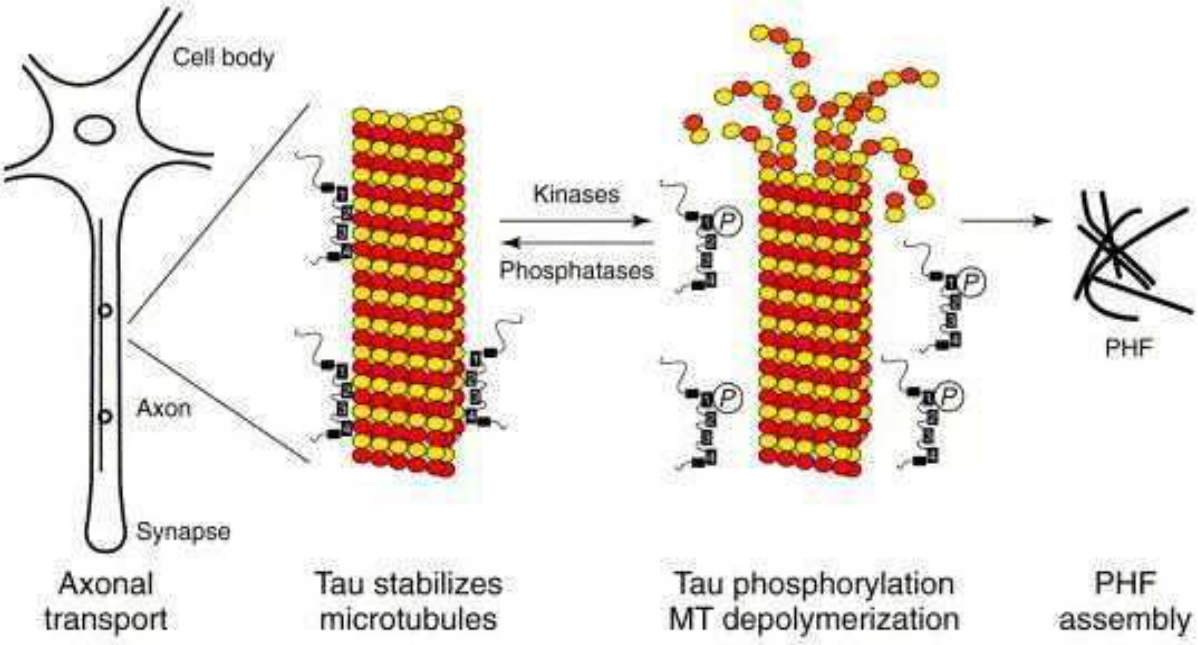
La protéine Tau :

Cette protéine fait partie de la famille des MAP : Microtubule Associated Protein (Frappier et al., 1994). Elle est codée par un gène situé sur le chromosome 17 (position 17q21) et constitué de 16 exons. Plusieurs isoformes de la protéine sont produites suite à un épissage alternatif de l'ARNm au niveau des exons 2, 3 et 10. Chez l'Homme, il existe 6 isofomes de taille variable de cette protéine,



<u>Figure 8</u> : Représentation schématique des six isoformes de la protéine Tau.

E10 : Exon 10
Source : Buée et al., 2010.



<u>Figure 9</u> : Représentation schématique de la déstabilisation du microtubule induit par la phosphorylation de la protéine Tau.

Source : Mandelkow and Mandelkow, 1998.

allant de 352 à 441 AA (de 45 à 65 kDa respectivement). Une des caractéristiques principales de la protéine Tau est qu'elle possède, dans sa partie C-terminale, des domaines répétés de liaison au microtubule. L'épissage ou non de l'exon 10 conditionne le nombre de ces domaines et ainsi le niveau d'affinité de la protéine pour le microtubule (Delacourte and Buée, 2005)(Buée et al., 2010). Il existe trois isoformes possédant trois domaines de liaison au microtubule : les formes 3R, et trois isoformes avec quatre domaines de liaison : les formes 4R (**figure 8**). L'épissage alternatif des exons 2 et 3 fait varier la taille d'une région située en N-terminale de la protéine Tau (Buée and Delacourte, 2006)(Schraen-Maschke et al., 2008).

Cette protéine subit également des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, des O-glycosylations, des glycations et des ubiquitinations (Wang and Liu, 2008).

Dans la MA, la protéine Tau retrouvée dans les PHF est dans un état dit d'hyperphosphorylation. En effet, en condition normale, la protéine Tau est phoshorylée sur 2 à 5 sites, alors qu'à l'état d'hyperphosphorylation (pathologique), la protéine Tau est phosphorylée sur une dizaine de sites différents (Kremer et al., 2011). Il existe plus de 85 sites potentiels de phosphorylation de la protéine dont la majeure partie est à proximité des domaines de liaisons au microtubule. Le niveau de phosphorylation module directement l'affinité de la protéine Tau pour le microtubule : un niveau élevé de phosphorylation entraine une baisse de l'affinité puis un détachement de la protéine Tau du microtubule (Mandelkow and Mandelkow, 1998)(Delacourte and Buée, 2005). Il a également été constaté que la protéine Tau à l'état hyperphosphorylée est capable d'auto-assemblage *in vitro* (pour revue : Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006). La dégénérescence neurofibrillaire observée dans la MA proviendrait alors d'un déséquilibre de l'activité des kinases et phosphatases de la protéine Tau (**figure 9**). Le problème est qu'il existe une multitude de combinaisons possibles de phosphorylation et qu'il y a plus d'une vingtaine de kinases différentes capables de phosphoryler Tau (Kremer et al., 2011). Les principales kinases identifiées sont : la GSK-3, la CaMKII, la CDK5, les MAPK (ERK 1 et 2, JNK…), la PKA et PKC (Buée and Delacourte, 2006) et les principales phosphatases sont : la PP2A (Protéine Phosphatase principale de Tau), PP2B, et la PP1 (Del Barrio et al., 2011)(Voronkov et al., 2011).

Il existe également des formes tronquées de la protéine Tau retrouvées au sein des NFT. Cette protéine peut, par exemple, être clivée par des protéases de la famille des caspases (Fasulo et al., 2000)(Gamblin et al., 2003) et des calpaïnes (Yang and Ksiezak-Reding, 1995), et peut être partiellement dégradée par le système ubiquitine / protéasome (David et al., 2002). D'après plusieurs auteurs, ces formes tronquées auraient la propriété d'accélérer l'auto-agrégation de la protéine Tau et ainsi accélérer la dégénérescence neurofibrillaire (García-Sierra et al., 2003)(Cotman et al., 2005).

La perte d'affinité et le détachement de la protéine Tau du microtubule rencontré dans la MA peut également s'expliquer par un déséquilibre de la balance des formes 3R et 4R suite à un dérèglement de l'épissage alternatif. Ce type de phénomène est observé dans des démences neurodégénératives héréditaires où des mutations du gène codant pour la protéine Tau ont été identifiées. Il s'agit des dégénérescences fronto-temporales avec syndrome Parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17 : Frontotemporal Dementia with Parkinsonism). L'ensemble de ces mutations retrouvées dans ces maladies sont soit au niveau de l'exon 10, soit à proximité des sites d'épissage de l'exon 10 (Delacourte and Buée, 2005)(Jaworski et al., 2010). Elles conduisent à une augmentation des isoformes 3R par rapport aux isoformes 4R, ce qui a pour effet d'entrainer une neurodégénérescence

progressive chez les sujets atteints par ce type de mutation. Il n'existe à ce jour, aucune mutation identifiée au niveau de ce gène dans la MA, mais ce déséquilibre d'isoforme a été repéré dans la plupart des maladies neurodégénératives sporadiques tel que la MA (Arai et al., 2003)(Umeda et al., 2004)(Kremer et al., 2011).

Rôle physiologique de la protéine Tau :

Le principal rôle de la protéine Tau est de promouvoir et de stabiliser l'assemblage des microtubules (un des éléments du cytosquelette) qui sont composés d'un polymère de tubuline (Schraen-Maschke et al., 2008). Le ratio d'isoformes 4R/3R, du fait des différences d'affinité pour ce microtubule, module directement la conformation de cette structure (Kremer et al., 2011). La partie N-terminale de la protéine Tau aurait également la propriété d'interagir avec le microtubule adjacent et ainsi de moduler l'orientation des microtubules (Schraen-Maschke et al., 2008). D'après plusieurs auteurs, les différentes tailles de la partie N-terminale obtenues par épissage alternatif de Tau, permettraient de moduler l'espace entre les microtubules (Jaworski et al., 2010)(Schraen-Maschke et al., 2008). La protéine Tau intervient donc dans l'architecture du neurone via ses interactions avec le microtubule.

Des interactions ont également été mises en évidences entre la partie N-terminale de la protéine Tau et les protéines dynéine et kinésine, responsables du transport actif des vésicules le long des microtubules (Utton et al., 2005)(Magnani et al., 2007). La perte de cette fonction entraine un défaut de fonctionnement des synapses en bloquant le transport vésiculaire des neurotransmetteurs (Delacourte and Buée, 2005), mais aussi un arrêt de l'autophagie qui nécessite le transport de vésicules jusqu'au lysosome (Lonskaya et al., 2014).

La phosphorylation de Tau, entrainant son détachement du microtubule, aurait un rôle dans le remodelage de la structure du neurone pendant les phénomènes de plasticité synaptiques : augmentation du nombre de synapses, augmentation de la taille des dendrites… En effet, ces phénomènes nécessiteraient des étapes de dépolymérisation du microtubule (Jaworski et al., 2010)(Buée and Delacourte, 2006). D'ailleurs, il a été montré que chez le fœtus, il n'existe qu'une seule isoforme de Tau (**figure 8**). Il s'agit d'une forme 3R donc de faible affinité pour le microtubule comparé aux formes 4R retrouvées chez l'adulte. Cette faible affinité serait nécessaire au développement du cerveau à ce stade en facilitant le désassemblage du microtubule (Buée and Delacourte, 2006)(Jaworski et al., 2010).

La protéine Tau jouerait également un rôle neurotrophique en passant par la transcription de gènes. D'après Sultan (Sultan et al., 2011), la protéine Tau est également située dans le noyau des cellules et plus précisément dans le nucléole, lieu de transcription de l'ADN. Lors d'un stress oxydatif ou induit par une élévation de la température, appliqué à des cellules en culture, il a été montré une baisse du niveau de phosphorylation de Tau au sein du cytosol et une augmentation de la protéine Tau au sein du noyau, ainsi qu'une interaction directe entre la protéine Tau et l'ADN identifiée par technique de co-immunoprécipitation. De plus, des cellules Tau KO ont présenté une moins bonne résistance lors de l'application de ces stress. L'auteur a donc conclu que Tau, à un certain niveau de phosphorylation, est capable de se détacher du microtubule et de migrer dans le noyau cellulaire, afin de réguler la transcription de certains gènes ou de jouer un rôle dans la protection des dommages à l'ADN. Dans la MA, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau entrainerait une perte de sa capacité à migrer dans le noyau, entravant ainsi son rôle protecteur.

Toxicité des dégénérescences neurofibrillaires :

Dans la MA, une forte perte neuronale est observée dans les régions les plus touchées par les DNF (Duyckaerts et al., 1999)(Spires et al., 2006). La toxicité induite par l'hyperphophorylation et les fibrilles de Tau reste encore mal comprise (Kremer et al., 2011). Cependant, le désassemblage du microtubule à un stade très avancé suffirait à entrainer la mort d'une cellule par arrêt du transport vésiculaire, entrainant l'arrêt de plusieurs fonctions de la cellule (Delacourte and Buée, 2005), comme l'autophagie qui ne jouerait alors plus son rôle dans le renouvellement des protéines et des organelles défaillantes (Correia et al., 2015). La déstructuration du cytosquelette entrainerait également une fragmentation de certaines organelles comme le Golgi et conduirait vers une mort non apoptotique de la cellule (Yoshiyama et al., 2003)(Gonatas et al., 2006).

Les lésions de type neurofibrillaire, de la même manière que les lésions de type amyloïde, s'accompagnent également d'une réaction gliale (astrocytose et microglie réactive)(Darios et al., 2005). En effet, dans les modèles animaux de tauopathie, une neuro-inflammation est décrite même en l'absence des dépôts amyloïdes (Yoshiyama et al., 2007)(Jaworski et al., 2010)(Jaworski et al., 2011).

Certains auteurs suggèrent que le niveau de toxicité de la protéine Tau serait fonction de son état d'agrégation. Tout comme le peptide Aβ, des formes solubles oligomériques (composées de quelques protéines agrégées) seraient les plus toxiques. La formation des fibrilles insolubles seraient alors protecteur en piégeant les formes les plus toxiques (Jaworski et al., 2010)(Tian et al., 2013). Cette hypothèse est confortée par des observations faites chez des souris transgéniques développant une tauopathie de type FTDP-17 : ces souris présentent une perte synaptique avant l'apparition des NFT (Yoshiyama et al., 2007).

La dégénérescence neurofibrillaire : une lésion spécifique de la MA ?

Une tauopathie est retrouvée dans la majorité des maladies neurodégénératives telle que la MA, ou des dégénérescences gliales (Yoshiyama et al., 2003)(Buée et al., 2000). C'est le cas par exemple de la maladie de Parkinson, des FTDP-17, de la paralysie supranucléaire progressive, de la dégénérescence cortico-basale, de la maladie de Pick, de la maladie des grains argyrophiles, et de la dystrophie myotonique de Steinert (Buée et al., 2000)(Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006)(Buée and Delacourte, 2006). En revanche, les neurofibrilles présentent des formes différentes dans ces maladies. Leur forme dépendrait directement de la population de cellules touchées et du ratio des différents isoformes de tau exprimés par ces cellules (Braak and Del Tredici, 2004). Par exemple, dans la MA, les fibrilles de Tau rencontrées dans les cellules pyramidales de l'hippocampe présentent un aspect de « flamme » alors que dans la paralysie supranucléaire qui touche des cellules microgliales, les fibrilles sont constituées uniquement par des formes 4R de Tau et présentent un aspect en « touffe » (Buée and Delacourte, 2006).

Les DNF sont également fréquentes au niveau de l'hippocampe chez les personnes âgées (Duyckaerts, 2004)(Buée and Delacourte, 2006). Elles seraient responsables des légers troubles de mémoires rencontrés avec l'âge de manière physiologique. Il est considéré que les DNF sont présentes au niveau du cortex entorhinal chez la moitié des personnes âgées de plus de 50 ans et chez toutes les personnes âgées de plus de 75 ans (Delacourte, 2006).

1.3.1.3. Les plaques séniles (PS)

Dans la littérature, le terme de plaque sénile est souvent associé aux dépôts amyloïdes. Mais, il désigne normalement une lésion histologique bien particulière, composée de l'association des dépôts amyloïdes et des NFT (Buée and Delacourte, 2006)(Braak and Braak, 1991). Le centre des plaques séniles est constitué d'un dépôt amyloïde dense et sphérique de 10 à 20 nm de diamètre. Ce noyau amyloïde est entouré d'une couronne de neurites dystrophiques (d'où le terme également trouvé de plaque neuritique) argyrophile contenant des inclusions de la protéine Tau organisées en PHF (Duyckaerts et al., 1999). Ces lésions sont donc à différencier des dépôts diffus qui sont moins focalisés et qui ne présentent pas de couronne de neurites dystrophiques. Ces plaques sont également entourées de cellules gliales réactives et il existerait, d'après certains auteurs, un gradient de concentration de peptide Aβ soluble ou sous forme de petits agrégats dans la périphérie du dépôt dense. Ce gradient proviendrait d'un équilibre entre les formes fibrillaires du peptide Aβ au sein du noyau, et entre les formes oligomériques solubles présentes en périphérie (Duyckaerts et al., 1999). Ces plaques constitueraient alors un « réservoir » à peptide Aβ oligomériques (Koffie et al., 2009).

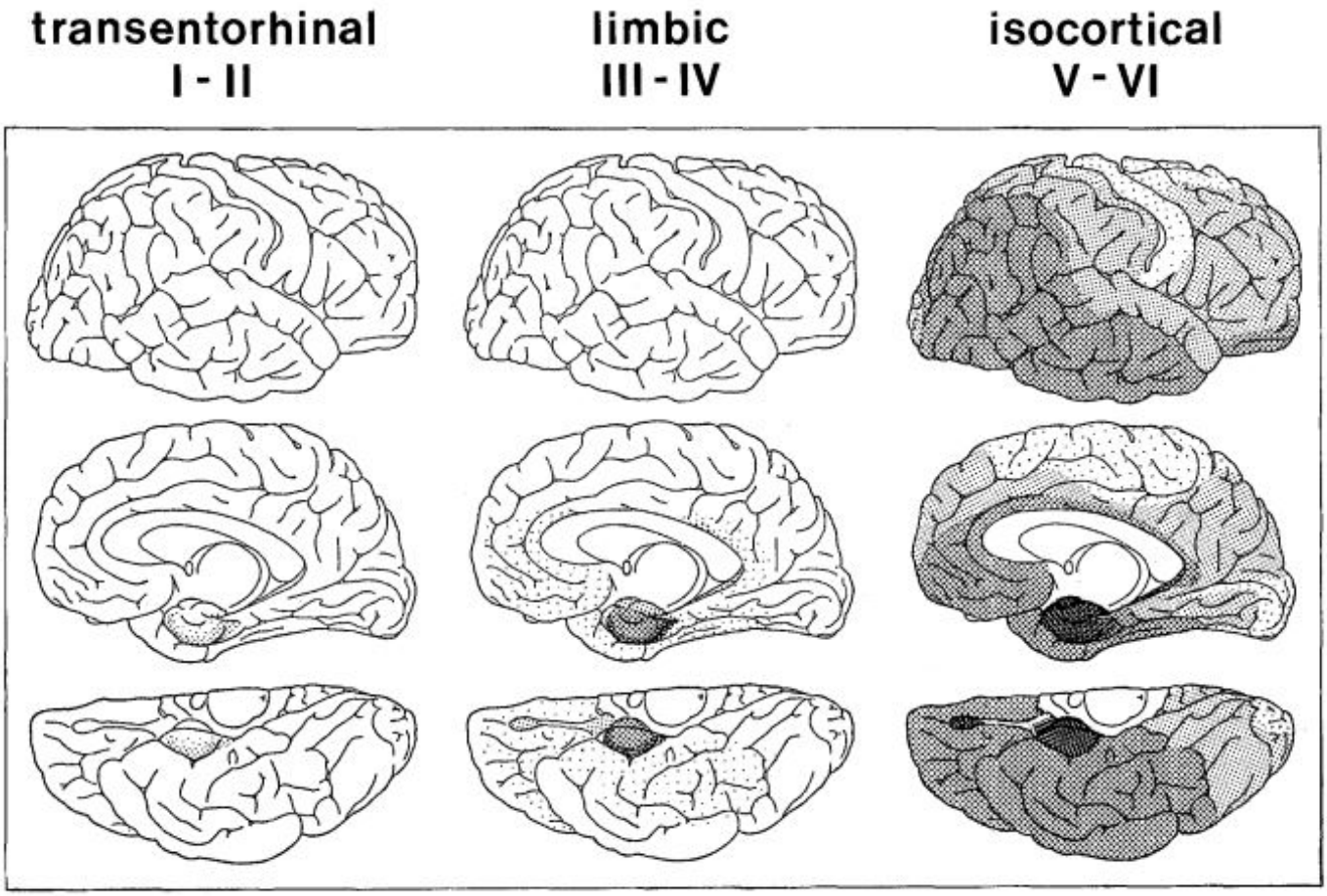
Ce type de lésion est caractéristique de la MA. Néanmoins, elle est également observée dans le syndrome de Down (Mrak and Griffin, 2004) et, dans quelques cas, chez des personnes âgées ne présentant pas les signes cliniques d'une MA (Mirra et al., 1991)(Kovacs et al., 2013).

1.3.1.4. Les autres protéinopathies

Chez certains cas de MA, d'autres types d'agrégats protéiques peuvent être retrouvés. Il s'agit d'agrégats intracellulaires constitués de la protéine α-synucléine ou de la protéine TDP-43.

L'α-synucléine est une protéine abondante dans les terminaisons synaptiques des neurones (Tsigelny et al., 2008). Dans la maladie de Parkinson, des agrégats fibrillaires de cette protéine mal conformée se développent au sein des corps de Lewy. Ces corps de Lewy sont également retrouvés dans 50% des cas de MA (Postina, 2008). Les MA à corps de Lewy sont plus « agressives » avec un déclin cognitif plus rapide (Clinton et al., 2010). Il a été démontré qu'il existe des interactions entre la protéine α-synucléine et la protéine Tau ou le peptide Aβ. Par exemple, l'α-synucléine serait capable de promouvoir l'auto-agrégation de la protéine Tau *in vitro* (Kotzbauer et al., 2004). Des études de co-immunoprécipitation ont également mis en évidence une interaction directe entre le peptide Aβ et l'α-synucléine (Tsigelny et al., 2008). Dans un modèle de souris transgénique présentant des DNF et des dépôts amyloïdes, l'ajout d'un transgène codant pour la protéine α-synucléine induit une amplification du nombre des agrégats de protéine Tau et de peptide Aβ (Clinton et al., 2010). D'après certains auteurs, l'Aβ monomérique et l'α-synucléine seraient capables de se complexer sous forme de pores au niveau de la membrane plasmique. Ces pores participeraient à l'afflux de calcium intracellulaire observé sur des neurones en présence du peptide Aβ (Tsigelny et al., 2008).

Dans 25 à 30% des cas de MA, des agrégats intracytosoliques de protéine TDP-43 sont présents dans les neurones et le tissu glial. Ces cas sont également associés à une forme plus sévère de MA (Josephs et al., 2008). La protéine TDP-43, pour Transactive response DNA-binding Protein et 43 pour sa masse exprimée en kDa, est présente dans les noyaux cellulaires où elle est impliquée dans la régulation de la transcription (rôle de répression). Des inclusions intracytosoliques de cette protéine sont retrouvées dans diverses maladies neurodégénératives comme les dégénérescences



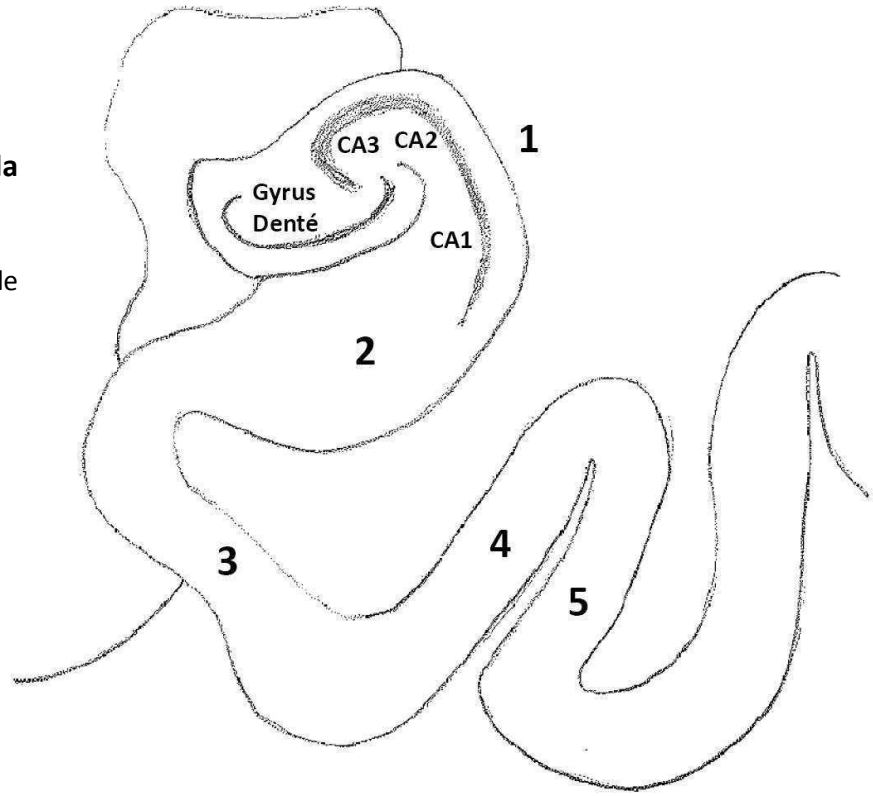
<u>Figure 10</u> : Les six stades de propagation des DNF de Braak et Braak.

Les différentes nuances de gris représententent la sévéritée de la pathologie neurofibrillaire.
Source : Braak and Braak, 1991.

<u>Figure 11</u> : Schéma représentatif de la région rhinale et de l'hippocampe.

Schéma en coupe coronale, adapté de Braak and Braak, 1991.

1 : Hippocampe
2 : Subiculum
3 : Cortex entorhinal
4 : Cortex transentorhinal
5 : Isocortex temporal



fronto-temporales (Wilson et al., 2011). Dans la MA, il a été constaté que les neurones présentant ces inclusions, correspondent à des neurones en dégénérescence neurofibrillaire (Amador-Ortiz et al., 2007). En revanche, aucune interaction directe n'a été démontrée entre cette protéine et la protéine Tau ou le peptide Aβ (Wilson et al., 2011).

1.3.2. Une propagation spatio-temporelle spécifique de la maladie

Si les lésions histologiques et les diverses protéinopathies retrouvées dans la MA peuvent être retrouvées dans d'autres maladies neurodégénératives ainsi que dans les dégénérescences gliales ou simplement dans le cadre d'un vieillissement normal, la progression des dégénérescences neurofibrillaires, en revanche, suit un ordre bien spécifique à la maladie (Buée and Delacourte, 2006). Des stades d'avancée des lésions de type DNF ont pu être ainsi établis par l'étude post-mortem de sujets âgés atteints ou non par la MA. La propagation des lésions de type dépôts amyloïdes et plaques séniles a également fait l'objet de recherches, mais leur progression semble moins hiérarchisée que l'évolution des DNF.

1.3.2.1. Progression spatio-temporelle des DNF

Dans la MA, les changements neurofibrillaires (NFT, NT et ghost tangles) induit par l'hyperphosphorylation de la protéine tau apparaissent, dans une zone du cerveau bien précise : le cortex transentorhinal. Ces lésions s'étendent ensuite au cortex entorhinal puis à l'hippocampe avant de toucher d'autres zones du cerveau suivant un ordre précis. Cette propagation particulière a été classée suivant des stades en fonction de l'avancée des lésions dans les différentes régions du cerveau. La première classification, qui est largement admise par la communauté scientifique, a été définie par Braak et Braak (Braak and Braak, 1991). Elle a été réalisée à partir d'examens histologiques de 83 cerveaux de sujets atteints de MA plus ou moins sévère ou sans aucun signe de démence. Cette classification se divise en six stades qui sont eux-mêmes regroupés deux par deux, en trois étapes (**figure 10**) :

- <u>L'étape transenthorinale</u> : cette étape correspond à une atteinte de la région rhinale comprenant le cortex transentorhinal et le cortex entorhinal (**figure 11**).
  - <u>Stade I</u> : Apparition des changements neurofibrillaires dans la région transentorhinale (région située entre l'isocortex et le cortex entorhinal).
  - <u>Stade II</u> : Expansion des lésions au cortex entorhinal et à la région CA1 de l'hippocampe. La densité des lésions augmente au niveau du cortex transentorhinal. Cette densité diminue en fonction de la distance avec le cortex transentorhinal.

- <u>L'étape limbique</u> : cette étape correspond à l'envahissement des lésions au niveau du système limbique. L'auteur décrit le système limbique comme un pont neuronal liant le monde extérieur au monde intérieur (Braak et al., 2006). Cette étape est retrouvée notamment chez des patients développant les premiers signes cliniques de la MA.
  - <u>Stade III</u> : Région CA1 touchée modérément ainsi qu'une atteinte au niveau de l'amygdale. Présence de ghost tangles au niveau du cortex transentorhinal. Quelques lésions isolées au niveau de l'isocortex dans sa portion basale.

- Stade IV : Région CA1 fortement touchée. Les lésions atteignent également d'autres structures du limbique (putamen, noyau accumbens, amygdale) ainsi que d'autres couches de l'hippocampe. L'axe thalamus / hypothalamus présente aussi des NFT à ce stade. Beaucoup de ghost tangles (signe d'une forte perte de neurones) sont observés au niveau du cortex rhinal. Néanmoins, l'isocortex reste relativement épargné à ce stade.

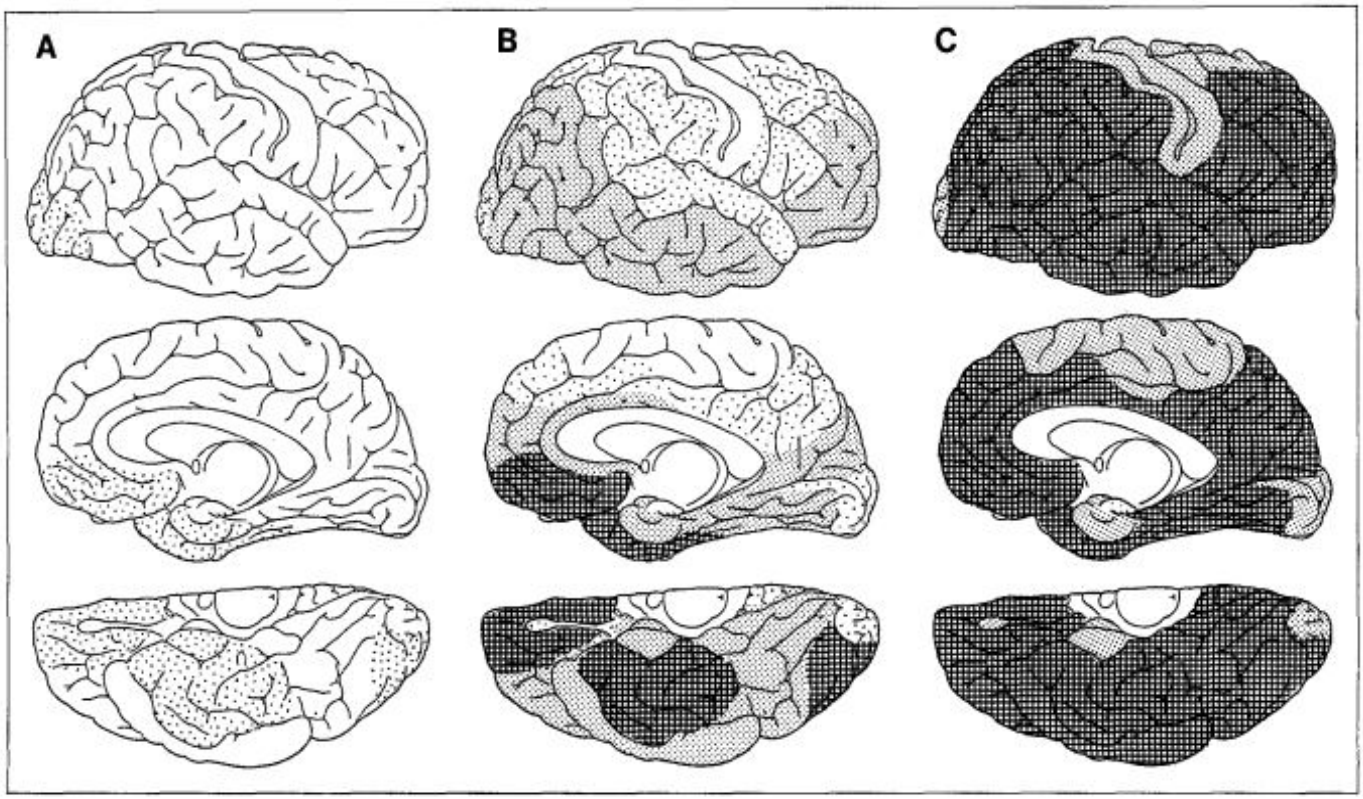
- L'étape isocorticale : cette étape correspond à l'expansion de la DNF à l'ensemble de l'isocortex. Cette structure du cerveau appelée également néocortex, correspond au manteau cortical, région la plus périphérique du cerveau, qui est caractérisée chez l'espèce humaine par ses circonvolutions. L'ensemble des patients situés à ce niveau d'atteinte, présentaient tous des signes de démence de type Alzheimer dans l'étude de Braak et Braak (Braak and Braak, 1991).
  - Stade V : Hippocampe touché dans son intégralité. Isocortex fortement atteint par les lésions au niveau de zones associatives.
  - Stade VI : Beaucoup de ghost tangles observés dans la zone CA1. Toutes les zones associatives de l'isocortex sont touchées. Atteinte de l'isocortex sensori-moteur ainsi que du striatum et de la substance noire.

Il existe une autre classification plus récente, définie par des méthodes d'analyse moléculaire, qui distingue 10 stades de l'évolution des NFT en fonction des 10 régions du cerveau atteintes successivement (Delacourte et al., 1999). Cette classification suit la même progression que celle décrite par Braak et Braak mais détaille d'avantage les différentes zones atteintes successivement au niveau de l'isocortex.

Ce schéma d'envahissement du cerveau par les NFT, bien hiérarchisé et relativement bien homogène entre différents patients, a engendré plusieurs hypothèses :

- Hypothèse de la gaine de myéline (Braak and Braak, 1996) :
  La dégénérescence neurofibrillaire toucherait d'abord la zone du cerveau où les axones sont de grande taille et présentent une gaine de myéline peu dense. Ce type de structure demanderait plus d'énergie pour transmettre un signal et serait donc plus soumis aux stress oxydatifs qui pourraient induire, avec le temps, cette dégénérescence. L'ordre d'atteinte des DNF dans la MA correspond effectivement à des structures dont les axones présentent une gaine de myéline de densité croissante.

- Hypothèse de la plasticité synaptique (Esiri and Chance, 2006) :
  De la même manière que l'hypothèse précédente, la vulnérabilité des régions serait dépendante de leur niveau de dépense énergétique. Or, les premières zones touchées par les DNF sont des régions à haute plasticité synaptique. Cette plasticité synaptique nécessite beaucoup d'énergie, et passe par la phosphorylation réversible de la protéine Tau lors du remodelage du neurone. Dans la MA, cette capacité de réversibilité serait perdue.



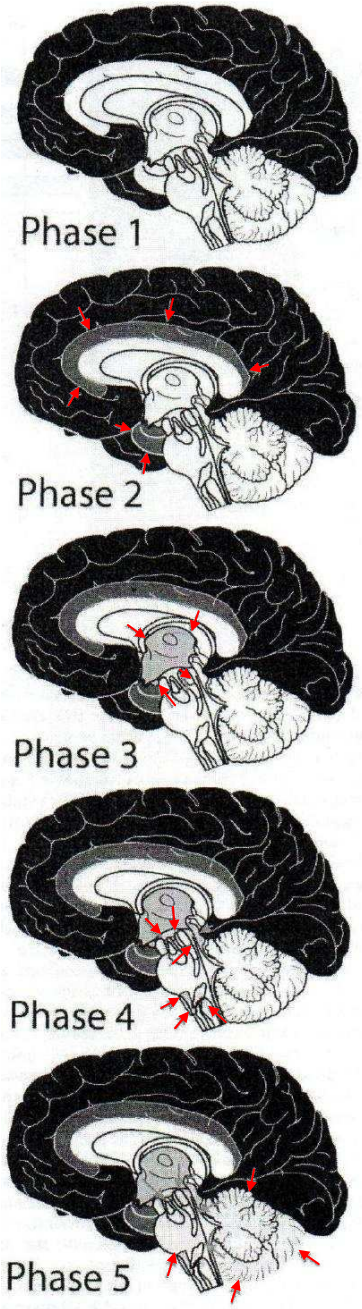
<u>Figure 12</u> : Les trois stades de propagation des dépôts amyloïdes de Braak et Braak.

Les différentes nuances de gris représententent une quantité de dépôts amyloïdes.
Source : Braak and Braak, 1991.

- Hypothèse de transmission par connectivité et « prion like » :
  Dans cette hypothèse, la transmission des NFT se ferait par connectivité inter-neurones entre les différentes régions du cerveau (Duyckaerts et al., 1999)(Delacourte et al., 2002). Elle découle de l'observation faite sur le mode de propagation de ces lésions qui semblent toucher des structures connectées entres-elles, comme par exemple les réseaux de fibres cholinergiques : une des premières structures atteinte est le noyau basal de Meynert (structure du limbique) qui innerve la plupart des structures corticales en fibres cholinergiques (Duyckaerts et al., 1999). Ensuite, les NFT touchent les différentes structures du cerveau suivant un ordre décroissant en densité de fibres cholinergiques. Par exemple, le système limbique, qui est riche en fibres cholinergiques, est atteint dès les premières phases de la maladie, contrairement au cortex sensori-moteur qui est pauvre en fibres cholinergiques (Esiri and Chance, 2006).
  Cette transmission des NFT par connectivité a également pu être vérifiée sur des modèles *in vivo* de la MA. Il a été constaté qu'une injection intracérébrale de protéine Tau sous forme d'agrégats, chez des souris transgéniques surexprimant la protéine Tau humaine, induit une propagation de NFT à partir du site d'injection et en suivant les structures connectées entre-elles (Lasagna-Reeves et al., 2012)(Sankaranarayanan et al., 2015)(Clavaguera et al., 2013). Suite à ce type de résultats, l'hypothèse d'une transmission de type prion a également fait son apparition. En effet, la présence de protéine Tau mal conformée (détachée du microtubule suite à phosphorylation) semble induire une propagation de cette mauvaise conformation, tel un prion (Clavaguera et al., 2013)(Kidd, 2006)(Vingtdeux et al., 2012). Cette hypothèse a également pu être testée chez une souris transgénique développant une tauopathie où la suppression du gène codant pour la protéine Tau par un système inductible (voir chapitre 2) ne permet pas de stopper la propagation de la tauopathie avec l'âge (Spires et al., 2006). La différence entre la propagation de la protéine Tau et la propagation de type prion est que la première nécessite des phénomènes de phosphorylation (Kidd, 2006).

1.3.2.2. Progression spatio-temporelle des dépôts amyloïdes

A l'inverse de la progression des NFT, les dépôts amyloïdes, dans la MA, présentent une distribution au sein du cerveau moins hiérarchisée et pas nécessairement localisée dans les mêmes zones (Delacourte, 2006). Néanmoins, plusieurs auteurs ont tenté de définir des stades de cette amyloïdopathie. Braak et Braak (Braak and Braak, 1991) ont défini trois stades (de A à C) d'évolution de ces lésions sur les 83 cerveaux étudiés (**figure 12**). Le premier stade (A) est difficile à définir car il y a une très grande hétérogénéité des lésions chez les sujets étudiés. Néanmoins, ils le définissent par un stade où les dépôts amyloïdes sont visibles au niveau de l'isocortex basal, sans être présents au niveau de l'hippocampe. Il n'y a pratiquement pas de plaques séniles à ce stade, ce qui démontre qu'il n'y a pas nécessairement chevauchement des DNF et des dépôts amyloïdes dans les premiers stades de la MA (Delacourte et al., 2002). Le stade B correspond à une atteinte de l'hippocampe par les dépôts et le stade C correspond à une atteinte de l'ensemble de l'isocortex. La densité des dépôts amyloïdes augmente de manière croissante du stade A au stade C. Les auteurs ont également constaté qu'il existait chez des sujets non déments, des cas présentant des NFT sans dépôts amyloïdes (jusqu'au stade III), et des cas présentant des dépôts amyloïdes sans la présence de NFT (jusqu'au stade B). En revanche, des NFT et des dépôts amyloïdes ont été retrouvés chez toutes les personnes diagnostiquées comme démentes.



<u>Figure 13</u> : Progression des dépôts amyloïde : stades de Thal.

Les zones grisées ainsi que les fléches rouges représentent la progression des lésions dans le temps.
Source : Thal et al., 2002.

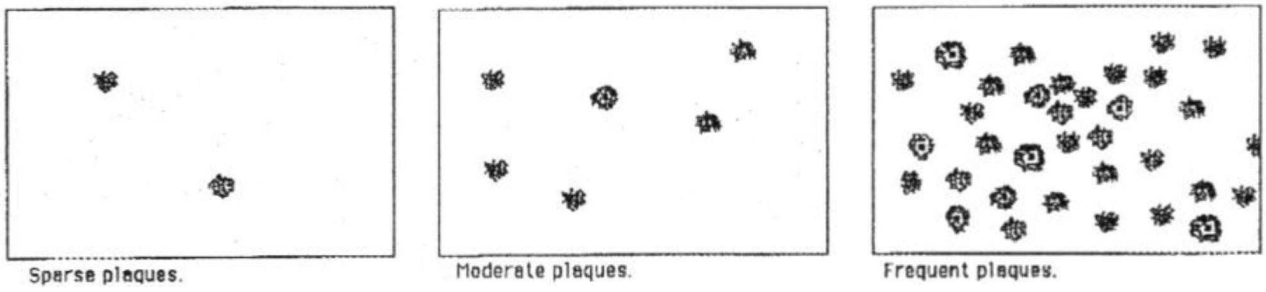
<u>Phase 1</u> : présence seulement dans l'isocortex.

<u>Phase 2</u> : expansion à l'allocortex dont l'hippocampe.

<u>Phase 3</u> : atteinte des fibres cholinergiques du noyau basal, ainsi que du striatum (non montré sur ce schém).

<u>Phase 4</u> : atteinte des noyaux du pont cérébral.

<u>Phase 5</u> : atteinte de l'intégralité du cerveau, dont le cervelet.



<u>Figure 14</u> : Dénombrement des plaques séniles : méthode CERAD.

La densité des plaques séniles s'établit suivant trois stades : clairsemées, modérées et fréquentes.
Source : Mirra et al., 1991

La progression des dépôts amyloïdes a été décrite d'une manière plus détaillée par Thal (Thal et al., 2002) qui définit cinq stades de progression de ces lésions. Les stades de Thal sont plus régulièrement cités dans la littérature mais ils sont également controversés car ils présentent l'inconvénient d'avoir été définis par l'examen de seulement 47 cerveaux. Ils sont définis selon la présence des dépôts dans certaines structures (**figure 13**):

- Stade 1 : présence seulement dans l'isocortex.
- Stade 2 : expansion à l'allocortex (désigne une région plus archaïque du cortex) dont l'hippocampe.
- Stade 3 : atteinte des fibres cholinergiques du noyau basal, ainsi que le striatum.
- Stade 4 : atteinte des noyaux du pont cérébral.
- Stade 5 : atteinte de l'intégralité du cerveau, dont le cervelet.

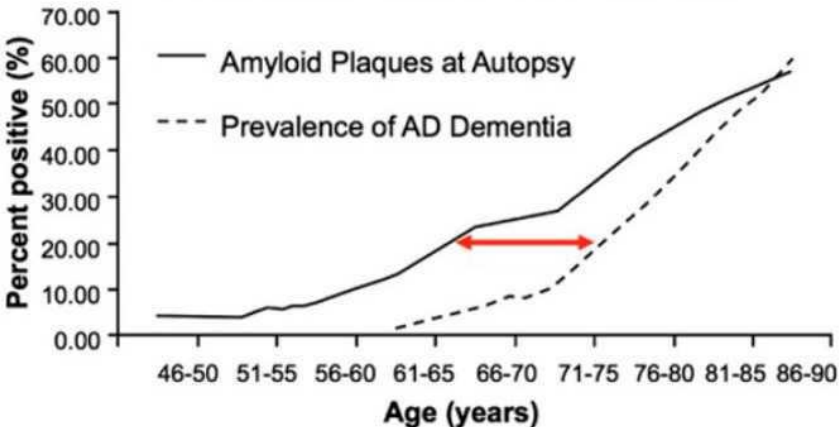
Contrairement à la propagation des NFT qui a donné lieu à plusieurs hypothèses, la propagation des dépôts amyloïdes reste encore mal comprise (Duyckaerts, 2004). Mais d'une manière générale, la densité des dépôts augmente avec l'avancée des stades des NFT. Il a également été constaté que ces dépôts sont constitués de peptide Aβ42 dans les premiers stades des NFT, alors que l'apparition du peptide Aβ40 dans ces agrégats intervient à des stades plus tardifs (Delacourte et al., 2002).

1.3.2.3. Progression spatio-temporelle des plaques séniles

La distribution des plaques séniles (PS) est considérée comme trop hétérogène pour pouvoir réaliser une classification suivant une localisation (Braak and Braak, 1991). Néanmoins, une méthode standardisée de diagnostic post-mortem (méthode CERAD) utilise le dénombrement de ces plaques pour établir un score de probabilité d'atteinte de la MA (Mirra et al., 1991). La note attribuée va de A à C : A pour MA possible, B pour MA probable, et C pour MA définie. L'attribution de cette note est fonction du déclin cognitif, de la présence de lésions comme les NFT, de la densité des plaques séniles dans une région du néocortex standardisée, mais également de l'âge du patient car ce type de lésions peut être retrouvé avec l'âge. La densité des plaques séniles s'établit suivant trois stades : clairsemées, modérées et fréquentes (**figure 14**). Il est à noter que lors de l'établissement de ces critères, deux sujets sur 150 au total, présentaient une densité de PS de modérée à fréquente sans pour autant présenter de signes cliniques.

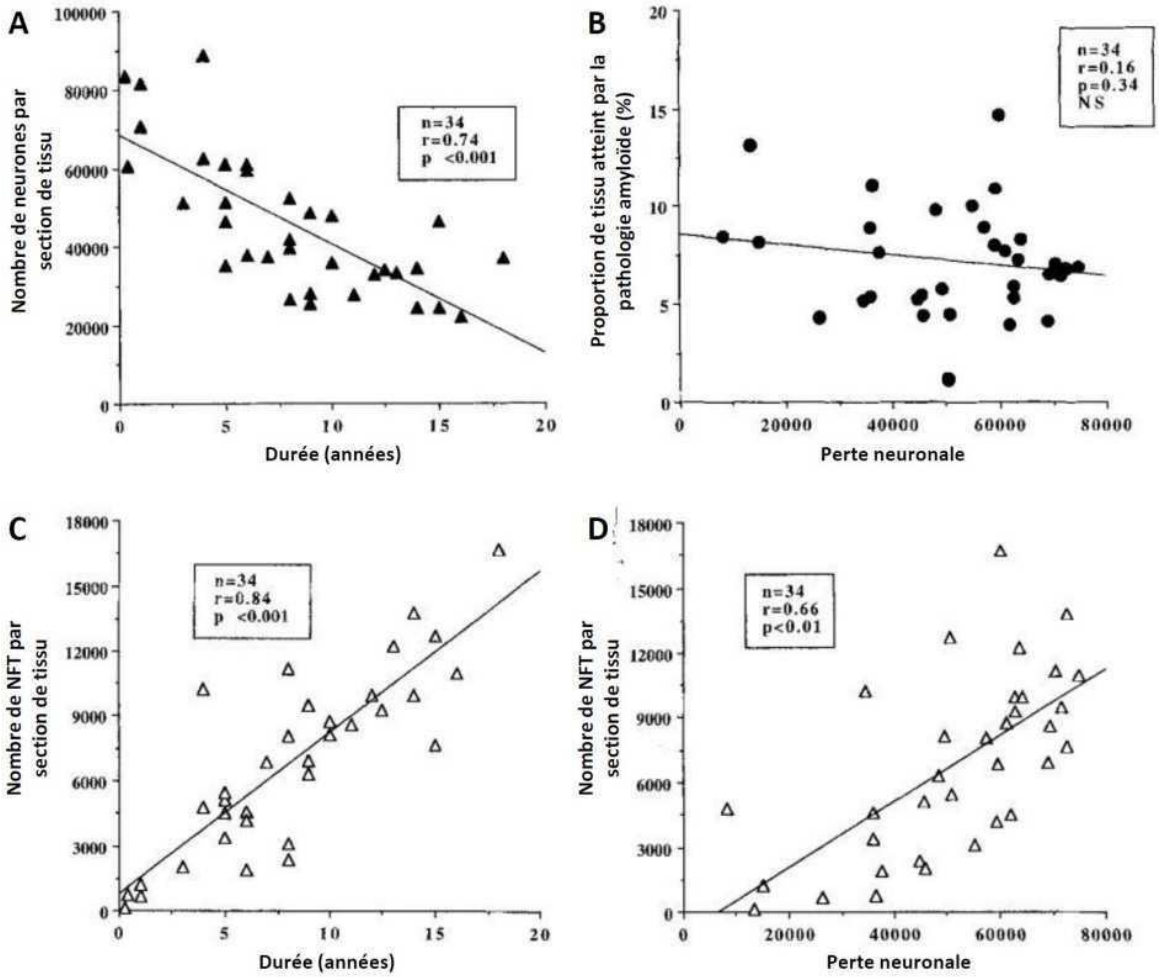
1.3.2.4. Progression des signes cliniques de la MA

La MA passe d'abord par une phase asymptomatique (ou préclinique) où les lésions pathologiques se développent progressivement dans le cerveau de manière insidieuse. Cette phase pourrait durer plusieurs années voire plusieurs décennies avant que le diagnostic de MA ne soit établi (Morris, 2005)(Craig-Schapiro et al., 2011)(Roh et al., 2012)(Braak and Braak, 1997). Lors d'examens post-mortem, il a été constaté que le pourcentage de sujets présentant des dépôts amyloïdes correspond au pourcentage de sujets diagnostiqués Alzheimer mais âgés de 10 ans de plus (Sperling et al., 2011 : **figure 15**). Les premiers signes de troubles cognitifs correspondent au stade MCI pour Mild Cognitif Impairment (ou déficit cognitif modéré). C'est un stade, qui précède la démence de type Alzheimer. Toutes les personnes au stade de MCI ne développeront pas nécessairement la MA.



<u>Figure 15</u> : Apparition des plaques amyloïdes et de la démence en fonction de l'âge.

Graphique obtenue à partir de données provenant d'études épidémiologiques. Un écart d'aproximativement 10 ans, existerait entre l'apparition des dépôts amyloïdes et le syndrôme de démence de type Alzheimer (fléche).
Source : Sperling et al., 2011**.**



<u>Figure 16</u> : Corrélation entre la durée de la maladie, la densité des NFT, la charge amyloïde et la perte neuronale.

Les données proviennent de l'étude *post mortem* de 34 cerveaux de patients atteints de MA. Les analyses sont réalisées dans une zone du lobe temporale proche de l'hippocampe.
A : Corrélation entre la perte neuronale et la durée de la maladie.
B : Pas de corrélation constatée entre la charge amyloïde et la perte neuronale.
C : Corrélation entre le nombre de NFT dénombrés et la durée de la maladie.
D : Corrélation entre le nombre de NFT dénombrés et la perte neuronale.
Source : Gómez-Isla et al., 1997.

D'après Petersen (Petersen, 2003), 70% des MCI présentant des troubles mnésiques évoluent en MA avec un taux de conversion de 10 à 15% par an. La MA est diagnostiquée seulement quand tous les signes d'une démence sont avérés et que d'autres critères de diagnostic sont positifs (atrophie cérébrale, biomarqueurs du LCR…).

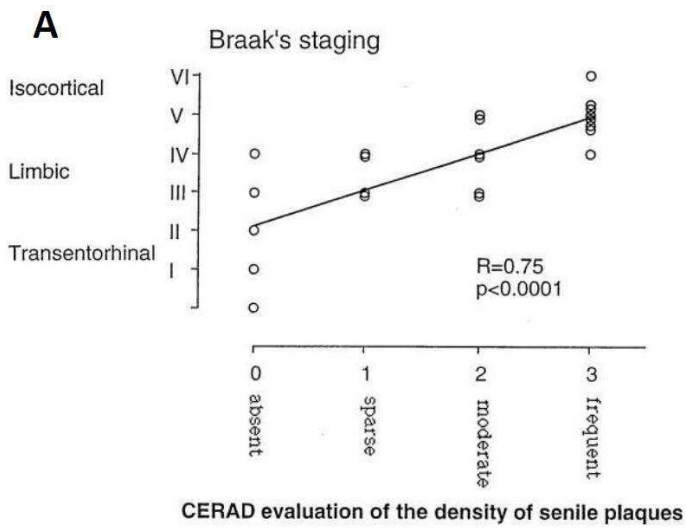
1.3.2.5. Corrélation entre les stades de la MA et la progression des lésions

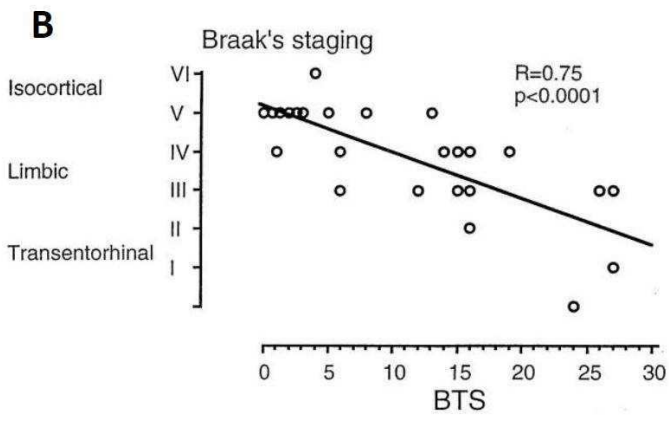
Les lésions de type DNF sont considérées comme les mieux corrélées avec les déficits de mémoire. L'ordre d'atteinte de certaines structures correspond à l'ordre d'apparition des symptômes, contrairement à la propagation des dépôts amyloïdes (Jaworski et al., 2010). Par exemple, les premiers signes de perte de mémoire correspondent à une atteinte de l'hippocampe, lors des stades III et IV de Braak et Braak, qui est une structure connue pour son rôle dans la formation de la mémoire (voir chapitre 3). La démence apparaît seulement quand l'isocortex est sévèrement atteint, c'est-à-dire au delà du stade IV (Delacourte and Buée, 2005)(Braak and Braak, 1991)(Duyckaerts et al., 1999). Il s'avère également que l'ordre des régions atteintes par les NFT correspond à l'ordre des zones du cerveau présentant une diminution de leur métabolisme (visualisée au PET-Scan) ainsi qu'une atrophie visible en IRM (Jack et al., 2013). La corrélation entre les NFT, la perte de neurones et l'avancée de la maladie a également pu être vérifiée avec des examens post-mortem réalisés chez des personnes atteintes de MA (Gómez-Isla et al., 1997) : plus le nombre d'années suivant le diagnostic de la MA est élevé, plus la perte neuronale est importante et plus la densité des NFT dénombrés au niveau du lobe temporal (dans une région proche de l'hippocampe) est élevée. En revanche, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de dépôts amyloïdes et la perte de neurones (**figure 16**).

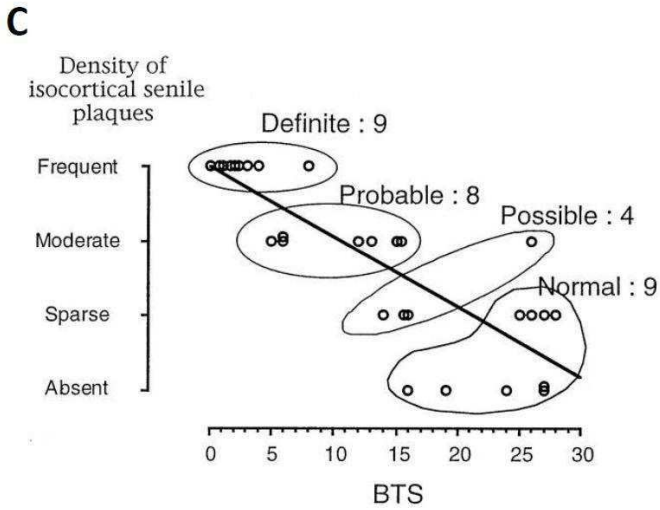
Lors de l'établissement des stades de l'avancée des dépôts amyloïdes, Thal (Thal et al., 2002) a constaté que des dépôts amyloïdes pouvaient être présents jusqu'au stade 3 (atteinte d'une partie de l'isocortex, de l'hippocampe et des fibres cholinergiques) sans observer la présence de signes de démence. Le même type d'observation à été réalisée par Braak et Braak (Braak and Braak, 1991) où certaines personnes non démentes présentaient des dépôts amyloïdes au niveau de l'isocortex basal et de l'hippocampe (stade A et B). A l'inverse, les personnes atteintes de démence de type Alzheimer présentaient toutes une large atteinte du cerveau par les dépôts amyloïdes, donc sans hiérarchie précise (stade C ou 3, 4 et 5).

Contrairement aux dépôts amyloïdes diffus, une corrélation plus nette à été mise en évidence avec les plaques séniles et l'évolution de la maladie. En effet, suivant le critère d'évaluation du CERAD, la densité des PS dans l'isocortex est directement corrélée avec l'évolution des stades de NFT (Braak and Braak, 1991) et le déclin cognitif (Nagy et al., 1995)(Duyckaerts and Hauw, 1997 : **figure 17**).

En conclusion (**tableau 1**), les lésions responsables de la MA apparaissent donc longtemps avant que le diagnostic de MA ne soit posé. L'apparition décalée des signes cognitifs serait due notamment à des mécanismes compensatoires permettant de « tolérer » ces lésions (Delacourte, 2006). C'est la notion de réserve cognitive. De plus, ces lésions ne sont pas spécifiques à cette maladie car elles sont retrouvées dans d'autres maladies ou de manière physiologique avec le vieillissement.

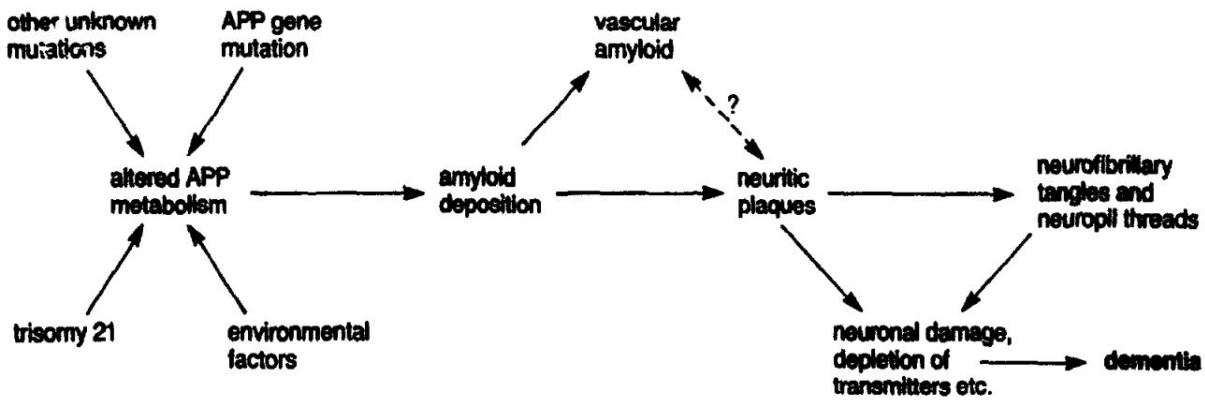






<u>Figure 17</u> : Corrélation entre les plaques séniles, les stades de Braak et Braak, et le déclin cognitif.

Les données proviennent d'études cliniques. BTS : Blessed test score (test d'évaluation cognitive).
A : Corrélation entre les stades de Braak et Braak et la densité des plaques séniles dans l'isocortex.
B : Corrélation entre les stades de Braak et Braak et le déclin cognitif.
C : Corrélation entre et la densité des plaques séniles dans l'isocortex et le déclin cognitif. Attribution d'un diagnostic en fonction des critères du CERAD (points entourés).
Source : Duyckaerts and Hauw, 1997.



<u>Figure 18</u> : Première apparition du concept de la cascade amyloïde.

Source : Hardy and Allsop, 1991.

Seule la progression des NFT à travers le cerveau des patients est réellement spécifique à la MA et en relation directe avec l'évolution des signes cliniques. Ces particularités rendent l'établissement d'un diagnostic compliqué et souvent tardif. En effet, lorsque la démence de type Alzheimer est avérée, les lésions sont étendues dans la majeure partie du cerveau et associées à une perte neuronale irréversible. Ce diagnostic tardif peut donc expliquer l'échec de l'ensemble des stratégies thérapeutiques testées en phase clinique, malgré des résultats qui pouvaient sembler encourageants chez des modèles animaux de la MA (Delacourte and Buée, 2005)(Thal et al., 2002)(Sperling et al., 2011).

Signes cliniques	**Stades NFT (Braak et Braak)**	**Stades dépôts amyloïdes (Braak et Braak)**	**Stades dépôts amyloïdes (Thal)**	**Densité des plaques séniles (CERAD)**
Asymptomatique	I	A et B	1, 2 et 3	Absentes à clairsemées
	II			
MCI	III	A, B et C	ND	Clairsemées à modérées
	IV			
Démence de type Alzheimer	V	C	3, 4 et 5	Modérées à fréquentes
	VI			

<u>Tableau 1</u> : Progression des différentes lésions et des signes cliniques de la MA.

ND : non défini.

1.3.3. Lien entre Aβ et Tau

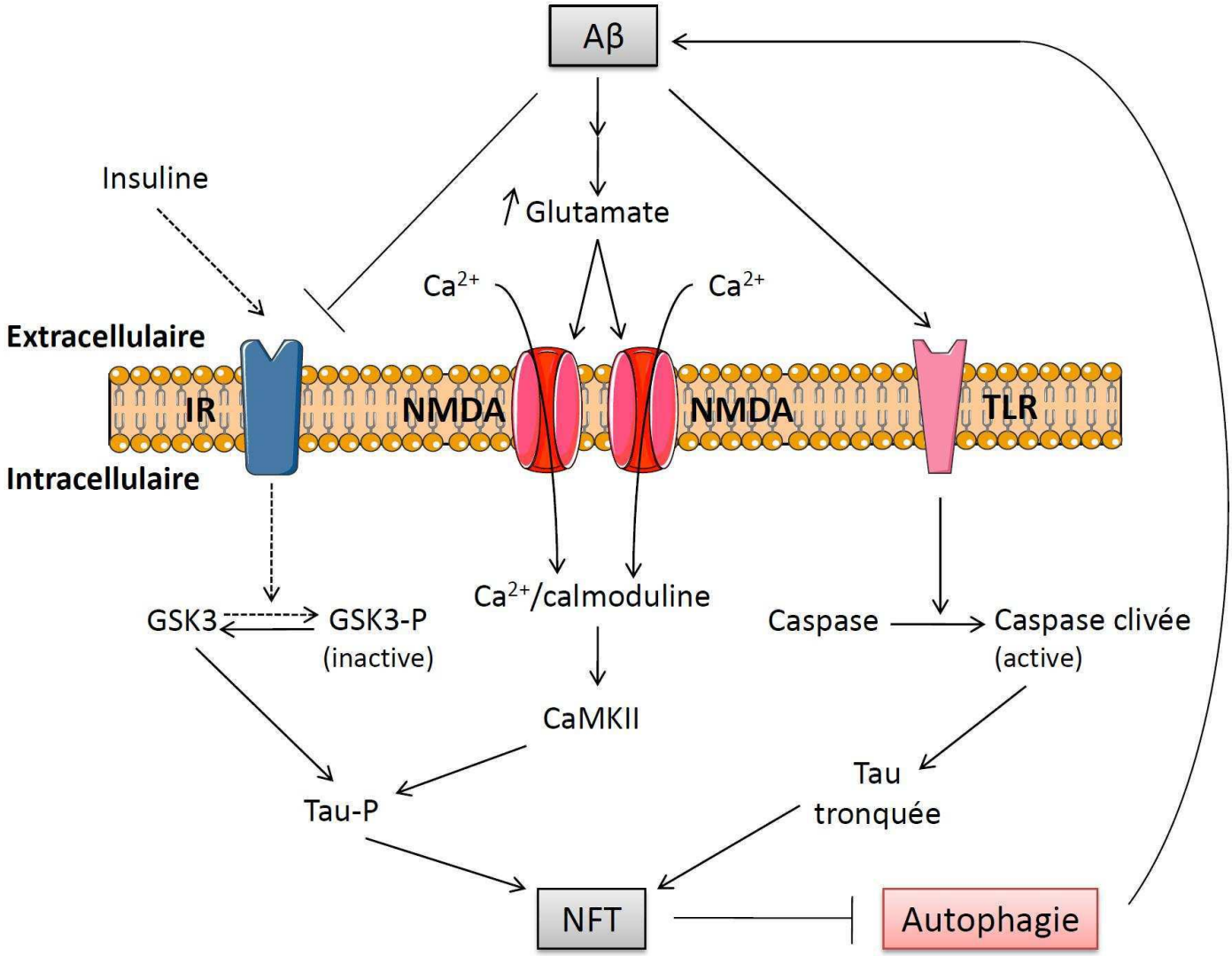
1.3.3.1. Hypothèse de la cascade amyloïde

Dans la recherche de la cause de la MA, le peptide Aβ semble être à la base de cette neurodégénérescence. Cette hypothèse, provient essentiellement du fait que dans les formes familiales de la MA, les mutations identifiées ne touchent que des gènes impliqués dans la production du peptide. Or, la tauopathie spécifique de la MA se développe chez ces formes familiales. La même constatation est faite chez des personnes atteintes du syndrome de Down : porteur d'un gène de l'APP surnuméraire situé sur le chromosome 21, qui présentent les mêmes types de lésions qu'une personne souffrant de MA, suite à une surproduction du précurseur du peptide Aβ. Les lésions de type DNF seraient alors qu'un « épiphénomène » de la toxicité induite par Aβ et les dépôts amyloïdes (Buée and Delacourte, 2006). C'est l'hypothèse de la cascade amyloïde qui a été énoncée pour la première fois par Hardy et Allsop (**figure 18**, Hardy and Allsop, 1991). Cette hypothèse est globalement admise par la communauté scientifique. Elle a été renforcée par plusieurs observations réalisées sur des modèles animaux où une surcharge amyloïde provenant d'un transgène ou d'une injection dans le cerveau de rongeurs, entrainerait une phosphorylation de la protéine Tau (voir chapitre 2). Cependant, il existe des arguments remettant en question cette hypothèse :

- Il existe des cas de personnes présentant des dépôts amyloïdes dans une large partie du cerveau, sans présenter de lésions de type DNF, ni de démence (Braak and Braak, 1991)(Thal et al., 2002)(Sperling et al., 2011). Il existe également des démences présentant des lésions amyloïdes sans DNF : c'est le cas des angiopathies amyloïdes de type Dutch (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006).
- La tauopathie n'est pas nécessairement associée à une amyloïdopathie. C'est le cas par exemple, des dégénérescences fronto-temporales. Des NFT peuvent être également présents de manière physiologique avec l'âge et sans la présence de dépôts amyloïdes (Delacourte, 2006)(Duyckaerts, 2004).
- Les NFT apparaissent au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe (stade I à III) avant les dépôts amyloïdes (Braak and Braak, 1997). Il n'y a donc pas chevauchement de ces deux lésions dans les premières étapes de la MA (Duyckaerts et al., 1999).
- La localisation hétérogène des dépôts amyloïdes ne permet pas d'expliquer la perte neuronale ainsi que les premiers troubles mnésiques observés dans la maladie, contrairement aux NFT (Nagy et al., 1995)(Braak and Braak, 1991).
- Plus récemment, des expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant la protéine tau humaine, ont montré qu'une injection de protéine Tau mal conformée pouvait induire une propagation de NFT, en l'absence de surcharge amyloïde (Clavaguera et al., 2013).
- Echec des stratégies thérapeutiques visant à contrer l'accumulation ou l'agrégation du peptide Aβ (pour revue : Franco and Cedazo-Minguez, 2014).

Dans le but d'expliquer ces différentes observations, des auteurs ont émis une hypothèse alternative à la cascade amyloïde : le peptide Aβ serait bien responsable de la MA mais serait obligatoirement précédé d'une étape de « fragilisation » des neurones par une dégénérescence neurofibrillaire (Buée and Delacourte, 2006)(Duyckaerts, 2004). Dans cette hypothèse, le peptide Aβ serait alors responsable de la propagation des NFT à l'ensemble du cerveau, NFT qui étaient présents de manière physiologique avec l'âge, mais confinés au système limbique. En effet, il semble évident que ces deux types de lésions soient capables de se développer de manière indépendante l'une de l'autre. Mais dans les observations de Braak et Braak (Braak and Braak, 1991), il n'existe pas de cas où les NFT dépassent le stade III sans la présence de dépôts amyloïdes, et d'après Delacourte, la concentration en dépôts amyloïdes est corrélée avec l'avancée des stades des NFT de Braak et Braak (Delacourte et al., 2002). La MA proviendrait alors de l'existence d'une synergie entre ces deux acteurs qui interviendrait avec un certain seuil de dépôts amyloïdes se propageant du néocortex au système limbique et atteignant, de ce fait, des neurones « fragilisés » par des NFT.

Des études épidémiologiques des biomarqueurs dans le LCR permettent d'aller dans le sens de cette hypothèse alternative. Il a été démontré que l'augmentation dans le LCR de la protéine Tau phosphorylée est le paramètre le mieux corrélé avec une conversion en MA chez des patients atteints de MCI (Schraen-Maschke et al., 2008). Cependant, lors d'un suivi longitudinal de patients, la diminution de peptide Aβ dans le LCR qui est un marqueur d'une agrégation du peptide dans le cerveau, intervient avant l'augmentation de la concentration en protéine Tau qui est le marqueur d'une neurodégénerescence associée à une perte de neurones (Jack et al., 2013). Donc, ces résultats confirment bien la nécessité d'une surcharge amyloïde intracérébrale pour déclencher la propagation de la dégénérescence neurofibrillaire et ainsi une MA.



<u>Figure 19</u> : Représentation hypothétique de la synergie entre le peptide Aβ et la protéine Tau.

CaMKII : Calmoduline dependant Kinase II
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
IR : Insulin Receptor
NFT : Neurofibrillary Tangle
NMDA : récepteur N-Méthyl-D-Aspartate
Tau-P : Tau Phosphorylée
TLR : Toll Like Receptor

1.3.3.2. Synergie entre Aβ et Tau

Malgré le fait qu'une synergie entre Aβ et Tau semble évidente (voir hypothèse de la cascade amyloïde), le lien entre ces deux protagonistes reste, à ce jour, mal compris et fait l'objet de plusieurs hypothèses (**figure 19**) :

- L'accumulation du peptide Aβ induirait une hyperphoshorylation de la protéine Tau par l'activation de kinases comme la GSK3 ou la CaMKII. En effet, l'afflux de calcium intracellulaire induit par le peptide Aβ via une accumulation de glutamate dans la fente synaptique, implique, entre autre, l'activation de la CaMKII par le complexe calcium/calmoduline (Wang and Wang, 2002). Ce flux de calcium pourrait également provenir de pores formés par un assemblage de peptide Aβ et de protéine α-synucléine (Tsigelny et al., 2008). Il existe également un lien décrit entre l'augmentation de la charge amyloïde et l'activité de la GSK3. Ce lien pourrait provenir de l'implication de l'insulino-résistance, c'est-à-dire une diminution de la concentration des récepteurs à l'insuline, rencontrée au niveau du cerveau de personnes atteintes de MA (Schiöth et al., 2012)(Frölich et al., 1999). Pour certains auteurs, cette insulino-résistance serait à la base de la MA (Correia et al., 2011) : une diminution de la voie de signalisation dépendante de l'insuline implique une levée de l'inhibition de la GSK3 (enzyme permettant d'inactiver par phosphorylation la glycogène synthase, donc de favoriser une libération de glucose intracellulaire) qui va alors induire la phosphorylation de la protéine Tau. La baisse de l'activité de cette voie implique également une diminution de l'activité de l'enzyme IDE (enzyme de dégradation de l'insuline mais aussi du peptide Aβ) se traduisant par une augmentation de la charge amyloïde extracellulaire. Le diabète de type II (insulino-résistant) est effectivement un facteur de risque connu de la MA et serait présent chez 80% des patients atteints par cette maladie (Arab et al., 2011). De plus, la région de l'hippocampe, qui est connue pour être une des régions les plus touchées dans la MA, présente une forte concentration en récepteur à l'insuline (Schiöth et al., 2012)(Unger et al., 1989). Mais, certains résultats suggèrent que le peptide Aβ serait capable d'induire directement cette insulino-résistance en agissant comme antagoniste des récepteurs à l'insuline. Il conduirait alors à la diminution de cette voie de signalisation (Xie et al., 2002), entrainant l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.
- Une autre hypothèse suggère que le peptide Aβ pourrait promouvoir l'agrégation de la protéine Tau via l'activation du signal de danger de l'immunité innée (voie PAMP/PRR). Cette voie peut être à l'origine d'un déclenchement de l'apoptose dépendant de protéases telles que les caspases. Or, la protéine Tau est un substrat de ces caspases. Il a été démontré que la protéine Tau sous forme clivée, induit une accélération de son auto-agrégation (voir chapitre 1.3.1.2).
- La protéine Tau sous forme hyperphosphorylée pourrait, quant à elle, contribuer à une augmentation de la charge amyloïde par un arrêt de l'autophagie. Une expérience sur des souris transgéniques produisant des dépôts amyloïdes, a permis de démontrer l'implication de la protéine Tau dans la formation de ces dépôts : les souris dont le gène Tau a été inactivé (Tau KO), présentent un nombre de dépôts amyloïdes plus important que celles dont le gène Tau est intact, et le nombre de ces dépôts peut être diminué par l'apport du gène Tau manquant via un vecteur viral (Lonskaya et al., 2014).

2. Les modèles expérimentaux de la MA

Depuis plusieurs décennies, la MA fait l'objet de nombreuses tentatives de modélisations. De nombreux modèles expérimentaux plus ou moins fidèles de cette maladie ont été développés afin d'en comprendre les mécanismes et de pouvoir développer des stratégies thérapeutiques. Ce chapitre dresse une liste non exhaustive mais représentative de la plupart des modèles retrouvés dans la littérature.

2.1. Modèles in vitro et ex vivo

Ces différents modèles sont essentiellement utilisés en recherche fondamentale pour l'étude des mécanismes de la MA impliqués dans la neurodégénérescence, l'inflammation et les perturbations de plasticité synaptique.

Modèles cellulaires :

Les cellules proviennent généralement de cultures primaires de neurones ou de cellules gliales de rats ou de souris. Certains utilisent également des cellules humaines issues de neuroblastomes. Ils permettent d'étudier spécifiquement l'action du peptide Aβ ou de l'hyperphosphorylation de Tau sur des populations cellulaires spécifiques. Ces modèles ont également permis de mieux comprendre l'implication des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA (FAD), lors du basculement vers la voie amyloïdogénique.

Exemple :

- Effet du peptide Aβ : La toxicité des différentes formes du peptide Aβ a été étudiée sur des neurones en culture. Il a été montré que les différentes tailles du peptide entrainent une toxicité cellulaire via notamment des phénomènes d'apoptose (Loo et al., 1993)(Zeng et al., 2011)(Lloret et al., 2008). Cette toxicité est largement dépendante de l'état de polymérisation et d'agrégation du peptide Aβ. Les formes oligomériques solubles (non fibrillaires) entrainent une plus grande toxicité que les formes fibrillaires insolubles, alors que la forme monomérique (retrouvée à l'état physiologique) est la moins toxique (Dahlgren et al., 2002). L'utilisation d'un peptide d'interférence permettant d'inhiber la polymérisation du peptide permet de réduire cette toxicité (Granic et al., 2010).
  En ce qui concerne les effets du peptide Aβ sur les cellules gliales, il a été observé une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de dérivés oxygénés (Lue et al., 2001) ainsi que d'une internalisation du peptide Aβ (Magistretti, 2011). D'après Harkany, le peptide Aβ induit également un blocage de la recapture du glutamate par les astrocytes (Harkany et al., 2000). Un autre point étudié est la toxicité du peptide Aβ sur les cellules endothéliales car il existe une angiopathie amyloïde dans la MA. Il a ainsi été montré que le peptide Aβ40 plus particulièrement induit une apoptose de ce type cellulaire (Fossati et al., 2012).

- Effet de l'hyperphosphorylation ou de l'accumulation de la protéine Tau : Plusieurs modèles utilisent l'acide okadaïque pour induire une hyperphosphorylation de la protéine Tau par inhibition de la phosphatase PP2A sur des neurones en culture. Il a ainsi été montré que cette hyperphosphorylation entrainait une dissociation de la protéine Tau du microtubule entrainant sa déstructuration et conduisant à la mort des neurones (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2006)(Del Barrio et al., 2011). Il a également été montré que l'agrégation de la protéine Tau au sein de cellules astrocytaires entrainait également leur mort par une déstructuration des microtubules puis une fragmentation du Golgi (Yoshiyama et al., 2003).

- Effet des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA : Des recherches ont également été menées sur l'impact des mutations retrouvées dans les FAD sur la production de peptide Aβ. Une augmentation du ratio Aβ42 / Aβ40 est observée sur des cultures de neuroblastomes exprimant certaines de ces mutations par rapport aux cellules sans mutation (Borchelt et al., 1996). Le même effet est observé avec une culture de bactéries recombinantes exprimant la protéine PS1 mutée après l'ajout d'un substrat APP wt, ou inversement, sur des bactéries exprimant PS wt avec un substrat APP muté (Ahn et al., 2010).

Modèles de plasticité synaptique *ex vivo* :

Il s'agit de modèles reproduisant et étudiant la formation de la mémoire sur des coupes d'hippocampe de rat ou de souris. La formation de la mémoire est ici observée par la mise en place de mécanismes de plasticité synaptique induisant une transmission synaptique facilitée appelée LTP (voir chapitre 3.1.3.3). Certaines études se concentrent également sur le phénomène inverse appelé LTD.

Exemple :

- Effet des différentes formes de peptide Aβ : Une diminution du phénomène de LTP (facilitation de la transmission synaptique) est observée sur tranches d'hippocampe avec le peptide Aβ (Itoh et al., 1999)(Chen et al., 2000b)(Min et al., 2011). Il est également décrit une augmentation du phénomène de LTD (Kim et al., 2001)(Li et al., 2009). L'effet de diminution de LTP est plus marqué avec les formes solubles oligomériques par rapport aux formes solubles monomériques ou fibrillaires (Lambert et al., 1998)(Wang and Wang, 2002)(Walsh et al., 2002)(Townsend et al., 2006)(Shankar et al., 2007). Ces résultats sont confortés par l'utilisation d'un inhibiteur d'oligomérisation qui montre une restauration partielle de la LTP (Walsh et al., 2005). Le peptide Aβ1-42 semble également agir de manière plus importante que le peptide Aβ1-40 sur cette diminution de la transmission synaptique (Nomura et al., 2012).

- Etudes des mécanismes impliqués : La baisse de la LTP induite par le peptide Aβ peut être inversée par l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur NMDA (Nomura et al., 2012), ou peut être reproduite grâce à un inhibiteur de la recapture du glutamate (Li et al., 2009). Plusieurs études ont aussi montré que des agonistes cholinergiques (ou des inhibiteurs de l'AchE) peuvent moduler la formation des LTP et la restaurer en cas d'inhibition par le peptide Aβ (Ondrejcak et al., 2012)(Kapai et al., 2012).

- Effet des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA : Des études ont également été réalisées sur des tranches d'hippocampe provenant de souris transgéniques exprimant des formes mutées de protéines impliquées dans les FAD. Par exemple, il est observé une baisse des LTP chez des souris PS1 muté ou APP/PS1 muté par rapport à des souris APP/PS1 wt (Odero et al., 2010)(Kiyota et al., 2011).

2.2. Modèles animaux

2.2.1. Naturels

A ce jour, la MA est considérée comme spécifique à l'espèce humaine. Néanmoins, il existe plusieurs espèces animales développant avec l'âge, des lésions neurodégénératives ainsi que des symptômes cliniques proches de la MA. Une amyloïdopathie avec la présence de dépôts diffus est constatée chez la plupart des espèces de mammifères lors du vieillissement (Selkoe et al., 1987) (Braak et al., 1994). En revanche, très peu d'espèces développent une tauopathie (Toledano et al., 2012).

D'une manière générale chez les rongeurs âgés (rats et souris), aucune formation de dépôts amyloïdes n'est observée, malgré une augmentation globale de la charge amyloïde intracérébrale (Puzzo et al., 2015). Ceci peut s'expliquer par une différence de trois acides aminés du peptide Aβ entre l'espèce humaine et le rongeur (Atamna et al., 2009). Néanmoins, il est constaté une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine Tau endogène (sans la formation d'agrégats), une diminution de la plasticité synaptique avec un déclin cognitif progressif et une augmentation de la concentration en cytokine pro-inflammatoire dans le cerveau (Stranahan et al., 2011)(Chan-Ling et al., 2007)(Terao et al., 2002). Il existe toutefois, une lignée de souris présentant plusieurs aspects de la MA dont l'apparition de dépôts amyloïdes avec l'âge, et qui est considérée comme un modèle représentatif de la forme sporadique de cette pathologie (Pallas et al., 2008). Il s'agit de la lignée SAMP8, issue des souris SAM (Senescence-Accelerated Mouse) qui ont été développées par élevage selectif à partir de la souche AKJ/R par Takeda depuis 1970 (source : Takeda et al., 1997). Ces souris présentent, en plus des signes de vieillissement accéléré observés chez toutes les souris SAMP, des déficits de mémoire et d'apprentissage marqués dans des tests de navigation spatiale dépendant de l'hippocampe (pour revue : Cheng et al., 2014) et des troubles du rythme circadien avec une fragmentation du sommeil et une augmentation de l'activité pendant les périodes diurnes (Pang et al., 2006). Des similitudes entre ces souris et la MA ont également été relevées au niveau neuropathologique : elles présentent une augmentation rapide de leur charge amyloïde intracérébrale avec l'âge (Kumar et al., 2000) associée à la formation de dépôts de peptide Aβ observés au niveau de l'hippocampe et du cortex mais qui ne possédent pas la propriété de biréfringence typique des plaques séniles après coloration au Rouge Congo (Takemura et al., 1993), une phophorylation anormale de la protèine Tau endogène et notamment en position sérine 422 (Sureda et al., 2006), ainsi qu'une perte de neurones et d'épines dendritiques avec la présence d'une réactivité gliale (Li et al., 2013).

Le chien âgé est considéré et utilisé comme modèle naturel et sporadique de la MA. Il développe avec l'âge des dépôts ainsi qu'une angiopathie amyloïde avec une atrophie cérébrale. Ces lésions de type Alzheimer sont également corrélées avec un déclin cognitif progressif. En revanche, cette espèce ne développe pas de tauopathie (Cotman and Head, 2008)(Martin et al., 2011)(Tapp et al., 2004).

Plusieurs recherches ont été menées sur les primates non humains. Des lésions relativement proches de celles retrouvées dans la MA (dépôts amyloïdes, Tau hyperphosphorylée et perte de fibres cholinergiques) sont développées chez quelques individus âgés dans la plupart de ces espèces. Mais il n'y en a peu qui développent des NFT associés aux dépôts amyloïdes en plaques neuritiques (Toledano et al., 2012). C'est néanmoins le cas de certaines espèces de macaques (comme le rhésus) ou de babouins qui développent ce type de lésions (Rosen et al., 2008)(Gandy et al., 2004). Mais, à ce jour, seul le microcèbe murin est connu pour développer des NFT avec la structure tridimensionnelle en PHF (Bons et al., 2006). Cette dernière espèce est d'ailleurs considérée comme celle qui développe une forme de pathologie la plus proche de la MA. Elle est utilisée comme modèle de MA sporadique car elle présente, en plus des PHF, des dépôts amyloïdes similaires à ceux retrouvés chez l'Homme (le gène de l'APP présente 100% d'homologie avec le gène humain), une atrophie du cerveau avec une perte de fibres cholinergiques, une neuroinflammation corrélée avec la charge amyloïdes, et un déclin cognitif avec une altération des interactions sociales entre individus ainsi qu'une perturbation du rythme circadien. Ces symptômes touchent environ 20% des individus âgés (à partir de cinq ans). La différence majeure entre ce modèle et la MA est que la progression spatio-temporelle des NFT diffère de celle spécifique de la MA : l'apparition des DNF a été observée au niveau du néocortex chez le microcèbe contrairement à la maladie humaine où les DNF apparaissent dans la région transentorhinal (Bons et al., 2006)(Calenda et al., 1998).

Le modèle naturel de MA sporadique le plus prometteur à ce jour, provient d'un rongeur qui développe les mêmes types de lésions que le microcèbe et qui présente donc les avantages de l'utilisation d'un rongeur au sein d'un laboratoire. Il s'agit de l'octodon (ou dègue du Chili). Cette espèce développe avec l'âge une accumulation de peptide Aβ intra et extracellulaire avec la présence de formes solubles oligomériques dont la forme Aβ*56 associée à un déclin cognitif (Popović et al., 2009). Elle développe également des dépôts amyloïdes proches de ceux rencontrés chez l'Homme (le peptide Aβ diffère que d'un seul acide aminé), des NFT avec une structure en PHF, ainsi qu'une augmentation des astrocytes réactifs (Braidy et al., 2012)(Braidy et al., 2015). Mais à ce jour, il n'y a aucune étude réalisée sur le développement et la progression spatio-temporelle des NFT chez cette espèce.

2.2.2. Par injections d'agents pharmacologiques mimant certaines caractéristiques de la MA

Une des stratégies utilisée dans la modélisation de la MA chez l'animal est de reproduire certaines « perturbations » biochimiques caractéristiques de cette pathologie. Plusieurs de ces caractéristiques ont ainsi été reproduites par injection de diverses substances pharmacologiques :

- <u>Voie cholinergique</u> :

Afin de simuler une baisse de l'activité cholinergique constatée dans la MA, une des stratégies est d'utiliser un antagoniste des récepteurs cholinergiques comme la scopolamine (antagoniste muscarinique). Cette substance produit des déficits de mémoire proche de ce qui est rencontré dans la MA (Pazzagli and Pepeu, 1965)(Vogel et al., 1967)(Deutsch, 1971)(Bores et al., 1996)(Szczodry et al., 2014). En fonction de la dose utilisée, elle produit d'abord un déficit de mémoire de travail,

puis un déficit de mémoire de référence (amnésie antérograde) avec un défaut de l'apprentissage (Kay et al., 2010). Mais un défaut majeur de cette substance est qu'elle provoque beaucoup d'effets périphériques indésirables.

Une autre stratégie est de détruire les fibres cholinergiques du noyau basal (incluant le septum médial et le noyau basal de Meynert). Cette méthode peut être réalisée par injection intracérébrale (généralement intra-ventriculaire) d'anticorps se fixant aux neurones cholinergiques et couplés à une toxine. Par exemple, l'utilisation d'anticorps monoclonaux (IgG 192) couplés avec la Saporine induit une toxicité par inhibition du ribosome. Ces anticorps possèdent une faible affinité pour le récepteur NGF (Nerve Growth Factor), or les neurones cholinergiques du noyau basal expriment largement ce récepteur. Cette technique permet de détruire ces fibres de manière spécifique sans atteindre les autres populations de neurones et ainsi de reproduire l'un des aspect de la MA (Book et al., 1992)(Gelfo et al., 2011).

- Voie Glutamatergique :

Dans la MA, les fibres glutamatergiques sont également atteintes, consécutivement à une surexcitation provoquée par une augmentation de la concentration en glutamate dans la fente synaptique (lésions excitotoxiques). Le glutamate est le ligand naturel des récepteurs NMDA, AMPA et kaïnates retrouvés au niveau post-synaptique des fibres glutamatergiques présentes notamment dans l'hippocampe. Cette surexcitation peut être reproduite par divers agonistes pharmacologiques de ces récepteurs :

- NMDA (N-Methyl-D-Aspartic acid) : agoniste des récepteurs NMDA. Par exemple, une injection au niveau de la région CA1 produit une destruction des neurones pyramidaux de cette région, ainsi qu'une altération de la mémoire de travail et de la mémoire de référence (Dillon et al., 2008).
- Acide domoïque : cette substance, isolée à partir d'une algue rouge pour la première fois au Japon, fait partie du groupe des acides kaïniques (agoniste des récepteurs kaïnates). Elle est responsable du syndrome d'intoxication amnésiante par fruits de mer. Cette substance peut être utilisée comme neurotoxine spécifique des fibres glutamatergiques. L'injection d'un analogue de l'acide kaïnique dans l'hippocampe entraine la destruction sélective des neurones de ce dernier, avec d'importants déficits de mémoire (Krogsgaard-Larsen and Hansen, 1992)(Sutherland and McDonald, 1990)(Antequera et al., 2012).
- Acide Iboténique : agoniste non sélectif des récepteurs au glutamate (NMDA, AMPA et kaïnate). Cette substance est retrouvée dans plusieurs champignons dont notamment les amanites. Elle est à l'origine d'hallucinations lors d'intoxication par ces champignons. Injectée dans l'hippocampe, cette substance produit également un puissant effet neurotoxique ainsi que des perturbations de mémoire associées (Malek et al., 2009)(Ogino et al., 2014).

- Induction d'une augmentation de peptide Aβ :

Une augmentation intracérébrale de peptide Aβ peut être induite par inhibition de son élimination. Par exemple, une injection intra-cérébro-ventriculaire de thiorphane (inhibiteur d'endopeptidase) chez le rat, entraine une augmentation du peptide Aβ1-40 par inhibition de la néprilysine (endopeptidase neutre). Des déficits de mémoire sont également associés à cette augmentation mais sans perte neuronale (Mouri et al., 2006).

- Induction de l'hyperphosphorylation de Tau :

Plusieurs substances permettent d'induire une phosphorylation de la protéine Tau via différents mécanismes :

- Isoprénaline : agoniste β adrénergique. Cette substance induit une augmentation de l'AMPc qui entraine *in fine* une entrée de calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium conduit à une activation de la CaMKII (une des kinases phosphorylant la protéine tau). Une injection d'isoprénaline dans l'hippocampe induit, par ce mécanisme, une hyperphosphorylation de la protéine Tau de manière transitoire (48 heures) et associée à des déficits de consolidation de la mémoire (Sun et al., 2005).
- La bradykinine est également utilisée en injection intra-hippocampique car elle produit un effet similaire avec une augmentation de calcium intracellulaire et l'activation de la CaMKII (Wang and Wang, 2002).
- Acide okadaïque : substance produite par le plancton et responsable d'intoxications alimentaires par fruits de mer. Cette substance inhibe spécifiquement l'activité des phosphatases PP1 et PP2A (phosphatases de la protéine Tau). L'injection intracérébrale de cette substance entraine une hyperphosphorylation de la protéine Tau par le déséquilibre de la balance kinases/phosphatases. Par exemple, son injection dans les fibres cholinergiques du noyau basal entraine une diminution de la concentration en acétylcholine dans ces dernières, induit probablement par la perte du transport vésiculaire liée à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Ce type d'injection entraine également une baisse des performances dans un test de navigation spatiale (Tian et al., 2004).
- Streptozotocine : substance toxique pour les cellules β des ilots de Langerhans. Cette substance est utilisée pour induire un diabète insulino-dépendant en recherche préclinique. Elle permet également d'induire une hyperphosphorylation de la protéine Tau si elle est injectée dans le cerveau (par exemple en intra-cérébro-ventriculaire), en produisant une insulino-résistance au sein des neurones. Cette insulino-résistance (également présente dans la MA) à pour effet d'activer la GSK3-β, une des principales kinases de Tau (Barilar et al., 2015).

2.2.3. Par injection de peptide Aβ

La technique la plus simple et la plus rapide pour reproduire les lésions de type amyloïde chez l'animal est d'injecter directement le peptide Aβ dans la zone du cerveau étudiée (par stéréotaxie). Cette méthode permet de produire une surcharge de peptide Aβ entrainant les lésions de type amyloïde dont les dépôts extracellulaires et la perte neuronale dans la zone d'injection.

Ces injections peuvent être effectuées sur plusieurs espèces comme le rat et la souris, mais également sur de plus grosses espèces comme le macaque (Forny-Germano et al., 2014).

Dans la littérature, les injections sont généralement réalisées au niveau de l'hippocampe ou en intra-cérébro-ventriculaire. Une injection au niveau de l'hippocampe (Ryu and McLarnon, 2008) permet d'étudier les effets de ce type de lésion dans cette structure qui est l'une des plus vulnérable dans la MA et qui serait responsable des premiers symptômes de perte de mémoire (voir chapitre 3.3.1.3). L'injection intra-cérébro-ventriculaire (Nitta et al., 1994)(Maurice et al., 1996)(Delobette et al., 1997) permet quant à elle de reproduire la surcharge amyloïde par diffusion du peptide, dans une zone plus vaste du cerveau, ce qui est plus proche de la distribution des dépôts observés dans la maladie (voir chapitre 1.3.2.2). De manière plus rare, des études se sont intéressées à l'effet d'une surcharge amyloïde dans d'autres zones cérébrales atteintes dans la MA comme le cortex entorhinal (Sipos et al., 2007), point de départ des NFT dans les stades de Braak et Braak, le cortex frontal (Dargahi et al., 2011) ou dans une autre structure du système limbique comme l'amygdale (Frappier et al., 1994).

Ce type d'étude a permis notamment de mieux comprendre le rôle des différentes formes du peptide Aβ. En effet, le peptide utilisé peut être de taille différente ou avec un certain niveau d'agrégation. Les différentes tailles retrouvées correspondent aux séquences 25-35, 1-40 et 1-42 du peptide Aβ. Certaines équipes utilisent même des mélanges de peptide 1-40 et 1-42 afin d'être plus proches de la composition des plaques séniles retrouvées dans la MA (Srivareerat et al., 2011). Ces différents peptides sont injectés soit sous forme soluble : fraichement préparé ou légèrement pré-agrégé afin d'obtenir des formes oligomériques solubles ; soit sous forme insoluble : peptide préalablement agrégé jusqu'à obtention de fibrilles insoluble (Chambon et al., 2011).

Plusieurs exemples d'études sont listés dans le tableau suivant (**tableau 2**). Mais d'une manière générale, l'injection de peptide Aβ permet de reproduire, en plus des dépôts amyloïdes et de la perte neuronale :

- des déficits des mémoires de travail et de référence dans divers tests.
- une neuro-inflammation avec une activation microgliale et astrocytaire associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et des dérivés oxygénés (Ryu and McLarnon, 2008).
- une phagocytose par les cellules microgliales retrouvées autour des dépôts (Nakagawa et al., 2004).
- une diminution de la capacité à former des phénomènes de plasticité synaptique (LTP) enregistrée *in vivo* (Hu et al., 2008)(O'Hare et al., 2014).
- une augmentation intracellulaire de calcium observée par marquage radioactif (Harkany et al., 2000).
- une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine Tau dans certains cas chez le rat (Cao et al., 2009) ou chez le macaque (Forny-Germano et al., 2014) mais sans la formation d'agrégats de Tau.
- une augmentation du nombre de NFT (5 fois plus au même âge) chez un modèle de souris transgénique Tau P301L (Götz et al., 2001a).

Espèce	Aβ	Lieu d'administration	Dose	Durée post-injection	Mémoire	Autre	Références
Souris	25-35	ICV	3 doses : -30 pmol, -300 pmol -1 nmol répétées en 10 injections sur 10 semaines	3 semaines	Déficit de mémoire de travail dose dépendant.	Perte de fibres cholinergiques dose dépendant à proximité des ventricules.	(Yamada et al., 2005)
Souris	25-35 agrégé	ICV	9 nmol	14 jours	Déficit de mémoire de travail dans un YM et baisse des performances dans un MWM.	Augmentation de l'expression de TNFα.	(Chavant et al., 2010)
Souris	42 soluble ou agrégé	ICV	205 pmol	2, 4, 24 heures	ND	Augmentation IL6 et TNFα plasmatique et dans le cerveau. Effet inhibé par un antagoniste adrénergique.	(Song et al., 2001)
Souris P301L de 5-6 mois	42 agrégé	Hippocampe et cortex	ND	45 jours	ND	5 fois plus de NFT avec Aβ. Astrocytes réactifs au niveau de l'hippocampe. Stabilité du peptide *in vivo.*	(Götz et al., 2001a)
Rat	42, 40, 25-35 soluble	ICV	Infusion de 300 pmol/jour sur 14 jours	14 jours	ND	Pic de BDNF de 3 à 7 jours dans CA1 et le gyrus denté ; pas d'effet pour le NGF quelque soit le peptide injecté.	(Tang et al., 2000)
Rat	25-35 soluble	ICV	10 et 100 nmol	5 minutes à 2 heures	ND	Diminution LTP (10nm) ; blocage LTP (100nm) au niveau des fibres collatérales de Shaffer *in vitro.*	(Freir et al., 2001)
Rates	42 soluble	ICV	Infusion de 300 pmol/jour sur 14 jours	14 jours	Déficit de la mémoire de travail en YM et MWM.	Une ovariectomie potentialise l'effet du peptide sur la mémoire.	(Yamada et al., 1999)
Rat	42 soluble	ICV	1-2 pmol	2 et 4 heures	ND	Diminution des LTP et augmentation des LTD enregistrées *in vivo* au sein de l'hippocampe.	(Kim et al., 2001)
Rat	42 soluble	ICV	Infusion de 2 et 4 nmol sur 3 jours	20 et 80 jours	Déficits dose et durée dépendant de la mémoire de travail et de référence dans un YM, MWM et PasA.	Modèle de MA progressif avec perte neuronale au niveau de CA1, perte de fibres cholinergiques, atrophie cérébrale et élargissement des ventricules.	(Nakamura et al., 2001)
Rat	42 agrégé	ICV	Courte infusion de 100 µg (22 nmol)	2,7 et 28 jours	ND	Le peptide Aβ envahit les ventricules entre 2 et 7 jours mais disparaît du ventricule à 28 jours.	(Nakagawa et al., 2004)

Rat	25-35 agrégé (7 j)	Hippocampe	19 nmol	7 jours	Diminution des performances dans un MWM.	Augmentation de la peroxydation des lipides et diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD, GSH).	(Shen et al., 2002)
Rat	40 soluble	7 lieux d'injections dans l'hippocampe	3 nmol par injection	14 jours	Diminution de la capacité d'apprentissage dans un labyrinthe.	Le peptide Aβ persiste au niveau du site d'injection et dans des macrophages après 14 jours. Perte neuronale observée.	(Malin et al., 2001)
Rat	40 agrégé	Hippocampe CA1	5 nmol	21 jours	ND	Rouge Congo positif ; corrélation entre augmentation IL1β et IL6 et augmentation de la glutathionne peroxydase.	(Rosales-Corral et al., 2004)
Rat	42 agrégé	Hippocampe CA3	0,5 nmol	80 jours	Troubles cognitif en OC.	Le peptide Aβ est stable *in vivo* (80 jours). Associé à une astrocytose réactionnelle.	(Richardson et al., 2002)
Rat	42 agrégé	Hippocampe CA1	9 nmol	14 jours	Baisse de la capacité d'apprentissage dans un MWM.	Rouge Congo positif ; astrocytose réactionnelle.	(Chacón et al., 2004)
Rat	42, 40 et 25-35 soluble	Cortex entorhinal	0,5 nmol ou 1 nmol de 42 + 0,5 nmol de 40	3 jours	ND	Rouge congo positif et fibrilles au microscope électronique seulement avec Aβ42 ; Aβ40 bloque la formation des feuillets β d'Aβ42 et diminue la perte neuronale induit par Aβ42 ; phosphorylation de Tau ; astrocytose réactionnelle.	(Zou et al., 2003)
Rat	42 et 25-35 soluble	Amygdales	5 nmol	8, 16 et 20 jours	ND	Augmentation du niveau de phosphorylation de Tau au niveau des neurones de l'amygdale.	(Chambers et al., 2000)
Rat	42 agrégé	Noyau basal	1,1 nmol	7 jours	ND	Rouge Congo positif, activation des astrocytes et de la microglie, diminution de la concentration en Ach.	(Giovannini et al., 2002)
Rat	42 agrégé	Corps calleux	1 nmol	6 heures, 3 et 7 jours	ND	Hypothèse de démyélinisation par inflammation : dommage aux axones et gaine de myéline, activation des astrocytes et de la microglie.	(Jantaratnotai et al., 2003)

<u>Tableau 2</u> : Exemple d'études avec injection de peptide Aβ.

ND : Non Documenté ; Ach : Acétylcholine ; LTP : phénomène de plasticité synaptique (voir chapitre 3) ; MWM, YM, OC, PasA : différents tests de mémoire (voir chapitre 3)

2.2.4. Par injection de la protéine Tau

Il existe quelques cas d'injections de la protéine Tau sous forme fibrillaire. Ces modèles sont extrêmement rares. Les agrégats de protéine Tau proviennent soit d'extraits de cerveau de patient atteint de MA (Lasagna-Reeves et al., 2012), soit d'extrait de cerveau de souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine mutée (Clavaguera et al., 2013), soit d'une production bactérienne exprimant le gène de la protéine Tau humaine (Sankaranarayanan et al., 2015). Une injection de cette protéine, mutée ou wt, déclenche une amplification de la tauopathie chez des souris transgéniques P301S (Sankaranarayanan et al., 2015)(Clavaguera et al., 2013) et une agrégation de la protéine Tau intracellulaire (NFT) chez des souris transgéniques hTau wt ou non transgénique (Clavaguera et al., 2013)(Lasagna-Reeves et al., 2012). En revanche, acune altération significative de la mémoire n'est décrite dans ces travaux, avec ce type de modèle animal.

2.2.5. Animaux transgéniques

Avec le développement de nouvelles technologies dans le domaine de la génétique et avec l'identification de mutations responsables de formes précoces et héréditaire de la MA (FAD), de nouvelles perspectives en termes de modélisation de la maladie se sont ouvertes aux chercheurs. De nombreux modèles d'animaux transgéniques basés sur l'apport de gènes humains mutés, ont alors été développés. Ils ont permis de réaliser d'importantes avancées sur la compréhension de la maladie et sont souvent utilisés dans le développement préclinique de nouvelles thérapies. Ces modèles sont essentiellement réalisés sur des souris, mais il existe également des modèles transgénique de drosophiles, nématodes, poisson zèbre … (Jaworski et al., 2010). Plus récemment, des modèles transgéniques de rats ont fait leur apparition (Do Carmo and Cuello, 2013).

Les premiers modèles de souris transgéniques sont apparus à partir de 1991. Ils étaient basés d'abord sur une surexpression du précurseur du peptide amyloïde (APP) humain sauvage (Quon et al., 1991)(Sandhu et al., 1991). Des modèles avec mutations FAD ont rapidement suivi (Games et al., 1995). Ils font suite à la découverte des formes familiales de la MA dans les années 1980 (Puzzo et al., 2015). Des mutations sur le gène de l'APP (chromosome 21) ont été les premières identifiées chez des familles développant la MA de façon précoce et héréditaire (liste non exhaustive) :

FAD :	Mutations :
London	V717I
Dutch	E693Q
Swedish	K670N / M671L
Flemish	A692G
Florida	I716V
Indiana	V717F

<u>Tableau 3</u> : Liste non exhaustive des principales FAD portant sur des mutations du gène de l'APP.

Plus tard, des mutations ont été découvertes sur les gènes de la préséniline 1 et 2 (chromosome 14 et 1 respectivement) pouvant également donner lieu à des FAD. Les FAD causées par une mutation de la préséniline 1 (PS1) sont les plus courantes (Elder et al., 2010). Il a été découvert plus de 160 mutations différentes sur ce gène mais elles ne conduisent pas toutes à la MA (www.alzforum.org). En revanche, il existe peu de formes de FAD avec mutation sur le gène de la PS2.

L'ensemble des mutations rencontrées dans les FAD conduisent à un déséquilibre du métabolisme de la protéine APP en faveur de la voie amyloïdogénique qui se traduit par une augmentation de la concentration en peptide amyloïde (Puzzo et al., 2015). En revanche, il n'a été découvert, à ce jour, aucune FAD induite par une mutation sur le gène codant pour la protéine Tau. C'est une des raisons qui conforte l'hypothèse de la cascade amyloïde et qui implique que la majorité des modèles transgéniques ne soient basés que sur une surproduction de peptide amyloïde. Cependant, il existe des modèles transgéniques de tauopathies basés sur l'apport du gène tau humain (chromosome 17) contenant une mutation rencontrée dans d'autres maladies neurodégénératives, ou basés sur une surexpression de la protéine Tau humaine wt. Les mutations les plus couramment utilisées sont rencontrées dans des formes familiales de dégénérescences fronto-temporales avec Parkinsonisme comme la maladie de Pick avec la mutation P301L (Elder et al., 2010). Ces mutations conduisent à une diminution de l'affinité de la protéine Tau pour les microtubules et tendent ainsi à augmenter leur niveau d'agrégation (Terwel et al., 2008)(Spittaels et al., 1999).

Dans le but d'augmenter la vitesse d'apparition des lésions ainsi que leur « agressivité » et de produire les deux principales lésions de la MA (dépôts amyloïdes et neurofibrilles de Tau), des modèles avec transgènes multiples ont été développés (APP/PS et triple transgénique) et ces transgènes sont systématiquement placés sous contrôle de promoteurs forts. Les principaux promoteurs utilisés sont : le promoteur du gène PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le promoteur de hamster PrP (Prion Protein), et les promoteurs des gènes murins Thy1 et Thy1.2.

2.2.5.1. Modèles basés sur une surexpression de peptide Aβ chez la souris

- **hAPP :**

Ces modèles sont basés sur une surexpression de la protéine APP humaine non mutée. Ils présentent une augmentation de la charge amyloïde dans le cerveau associée à la formation de dépôts diffus avec l'âge. Cependant, ces modèles ont rapidement été abandonnés car ils ne présentent aucun autre aspect de la pathologie : mort neuronale, inflammation, déficits de mémoires… (Quon et al., 1991)(Sandhu et al., 1991)(Pearson and Choi, 1993).

- **APP :**

  - PDAPP : C'est la première lignée de souris transgéniques développée avec l'apport du gène APP présentant la mutation FAD de type Indiana. Le promoteur utilisé est celui du gène PDGF humain (Games et al., 1995). Des dépôts amyloïdes sont observés à partir de six mois. Ils sont entourés de neurites dystrophiques et de cellules gliales réactives ce qui constitue des lésions proches des plaques séniles de la MA (Games et al., 2006)(Masliah et al., 1996). Une accumulation de la protéine Tau endogène sous forme hyperphosphorylée est également retrouvée au sein des neurones à partir de 14 mois mais sans la formation de filaments insolubles (Masliah et al., 2001). Ces souris présentent des déficits cognitifs qui apparaissent avant la formation des dépôts amyloïdes (Games et al., 1995) et atteignent un pic vers l'âge de 12-15 mois (Chen et al., 2000a). Cependant, peu de perte neuronale est observée dans ce modèle (Codita et al., 2006).

- Tg2576 : Ce modèle est basé sur l'apport du gène APP contenant la mutation Swedish. Il est placé sous contrôle du promoteur de hamster de la PrP (Hsiao et al., 1996)(Arendash et al., 2010)(Wesson et al., 2011). Cette lignée est la plus couramment utilisée pour modéliser la MA. Elle sert souvent à l'élaboration de modèle multi-transgénique (Elder et al., 2010). Ce modèle produit cinq fois plus de peptide Aβ (1-40 et 1-42) que le modèle PDAPP (Bryan et al., 2009). Les dépôts amyloïdes sont observés dans toutes les régions du cerveau mais apparaissent plus tardivement que dans la lignée PDAPP : 11-13 mois contre six mois. Des déficits de mémoire et une hyperphosphorylation de Tau (sans la formation d'agrégats) sont également retrouvés plus tardivement que chez les souris PDAPP (Hsiao et al., 1996). Dans ce modèle, le déclin cognitif est observé avant la formation des dépôts amyloïdes et a été associé à une diminution de la formation des LTP dans l'hippocampe (Chapman et al., 1999) et l'apparition d'une forme oligomérique soluble d'Aβ : la forme dodécamérique Aβ*56 (Lesné et al., 2006). En revanche, tout comme dans le modèle PDAPP, la perte neuronale est très faible (Elder et al., 2010).

- Autres : Il existe plusieurs autres variantes qui combinent différentes mutations FAD sur le gène APP avec plusieurs promoteurs différents. Par exemple, la lignée APP23 qui associe la mutation Swedish au promoteur du gène murin Thy1 et qui développe des dépôts amyloïdes avant la lignée Tg2576 : à partir de six mois (Calhoun et al., 1999) ; la lignée APP-Dutch avec le promoteur Thy1 qui surexprime essentiellement le peptide Aβ1-40 et qui développe une angiopathie cérébrale avec des dépôts amyloïdes vasculaires (Herzig et al., 2004) ; ou encore la lignée CRND8 qui combine deux mutations FAD (Swedish + Indiana) avec le promoteur PrP qui développe des dépôts amyloïdes précocement et avant l'apparition de signes cliniques : de neuf semaines à trois mois suivant les auteurs (Chishti et al., 2001)(Dineley et al., 2002)(Marr et al., 2004).

- **Aβ :**

Contrairement aux modèles basés sur une surproduction de la protéine APP, ces modèles permettent de reproduire seulement une sécrétion du peptide Aβ soit 1-40, soit 1-42. Ils consistent à transférer un gène chez la souris exprimant une protéine de fusion constituée du peptide Aβ et d'une protéine membranaire. La protéine membranaire utilisée (protéine BRI) conduit à un relargage extracellulaire d'un peptide de 23 AA impliqué dans une démence familiale (British) avec formation de dépôts amyloïdes. Ce peptide de 23 AA est ici remplacé par le peptide Aβ1-40 ou 1-42. La lignée transgénique BRI-Aβ42 développe des dépôts amyloïdes diffus puis denses avec l'âge (à partir de 12 mois au niveau de l'hippocampe) mais sans montrer de déficits cognitifs ou de pertes neuronales. A l'inverse, la ligné BRI-Aβ40 ne développe aucune lésion (McGowan et al., 2005).

- **PS1 :**

Les souris exprimant seulement le transgène de la préséniline avec une mutation FAD montrent une augmentation de la concentration en Aβ1-42 dans leur cerveau sans toutefois montrer de dépôts amyloïdes ou de déficits cognitifs. Exemple de souris PS1 FAD : PS1 avec la mutation M146V (Stern et al., 2004) ou M146L (Duff et al., 1996) placée sous le contrôle du promoteur PDGF et PS1 avec la mutation A246E sous le contrôle du promoteur PrP (Borchelt et al., 1996).

- **PS2 :**

Ces modèles transgéniques sont relativement rares. Comme pour les modèles PS1 mutés, ils surexpriment le peptide Aβ sans développer de dépots amyloides. Par contre, une activation de la cascade pro-apoptotique ainsi que des déficits de mémoire ont été décrits chez ces souris (PS2 avec la mutation N141I) à partir de 12 mois. Néanmoins, ces observations ont aussi été faites avec des souris transgéniques surexprimant la protéine PS2 wt et ne seraient donc pas liées à la mutation FAD (Hwang et al., 2002).

- **APP/PS1 :**

  - PSAPP : Cette lignée correspond à un croisement de souris tg2576 (APP Swedish) avec des souris transgéniques PS1 FAD (mutation M146V) dont le transgène est placé sous le contrôle du promoteur PDGF (Trinchese et al., 2004)(Bryan et al., 2009)(Park et al., 2013). Ce modèle développe des dépôts amyloïdes de manière plus précoce que la lignée Tg2576 (Holcomb et al., 1998). Les dépôts apparaissent à partir de six mois dans le cortex cérébral et l'hippocampe mais ils ne sont pas associés à une perte neuronale évidente (Takeuchi et al., 2000), ni aux déclins cognitifs qui apparaissent avant la formation de ces dépôts (Bryan et al., 2009). Les premiers déficits de mémoire correspondent d'abord à des troubles de la mémoire de travail (voir chapitre 3.1.2) associés à une baisse de la formation des LTP dans l'hippocampe observée à partir de trois mois (Trinchese et al., 2004), puis des déficits de mémoire de référence dans des tests de navigation spatiale (Liu et al., 2014). Il existe des variantes à cette lignée présentant des mutations différentes sur le gène de la PS1 (exemple : M146L) qui présentent le même type de résultats (Holcomb et al., 1998).

  - Tg2576 x PS1wt : Ce modèle, proche de la lignée PSAPP, ne présente pas de mutations sur le gène de la PS1. Il ne permet pas d'exprimer de dépôts amyloïdes ce qui souligne l'importance du rôle d'une mutation de la protéine PS1 sur le métabolisme de la protéine APP (Games et al., 2006).

  - Autres : Il existe diverses combinaisons de souris APP/PS1 conduisant à une forte production de peptide Aβ et à la formation de dépôts amyloïdes. C'est par exemple le cas de la lignée APP London croisée avec des souris PS1 A246E dont les transgènes sont placés sous le contrôle du promoteur Thy1 qui développe des dépôts amyloïdes avant la lignée APP London (Dewachter et al., 2000).

- **APP/PS2**

Ce type de modèle présente globalement les mêmes caractéristiques que les modèles APP/PS1. Par exemple, dans la lignée PS2/APP qui présente le gène codant pour la protéine humaine APP avec la mutation Swedish et le gène de la PS2 avec la mutation FAD N141I, des dépôts amyloïdes sont observés à partir de six mois et les troubles de mémoire apparaissent à partir de huit mois dans des tests de navigation spatiale (Kallop et al., 2014).

- **Multiples FAD**

Afin d'accélérer la formation des dépôts et dans le but d'observer une perte neuronale importante associée aux lésions amyloïdes, des modèles ont ensuite été développés en multipliant le nombre de mutations retrouvées dans des FAD :

- APPSLxPS1 KI : Ce modèle présente quatre mutations FAD. Les mutations Swedish et London sur le gène de l'APP et les mutations M233T et L235P sur le gène de la PS1 (PS1 Knock-In, c'est-à-dire dont le gène d'origine a été remplacé par le transgène). Ces gènes sont placés sous le contrôle du promoteur Thy1. Ces souris présentent une forte perte neuronale au niveau de l'hippocampe (supérieur à 50% à l'âge de 10 mois) mais sans la formation de dépôts amyloïdes. Cette perte neuronale est associée à une accumulation intracellulaire de peptide Aβ1-42 retrouvé également sous forme N-tronquée. Ces souris présentent des troubles de la mémoire de travail à partir de six mois (Kallop et al., 2014).

- 5xFAD : Modèle avec trois mutations FAD sur le gène de l'APP : Swedish, Florida et London ; et deux mutations FAD sur le gène de la PS1 : M146L et L286V (Aytan et al., 2013). Des dépôts amyloïdes sont observés chez ces souris dès l'âge de deux mois. Elles présentent également une forte perte neuronale associée à l'accumulation de peptide Aβ intracellulaire ainsi que des déficits de mémoire de travail dès l'âge de quatre mois (Oakley et al., 2006). En revanche, ces souris présentent également des troubles moteurs et la région CA1 de l'hippocampe (région vulnérable dans la MA) n'est que légèrement atteinte par la perte neuronale (Oakley et al., 2006).

2.2.5.2. Modèles basés sur une surexpression de tau chez la souris

A l'inverse de la multitude des modèles étudiant les mécanismes d'une surproduction de peptide Aβ, il n'existe que peu de modèles produisant une tauopathie rencontrée pourtant dans 100% des cas lors d'une MA. Ceci s'explique par le fait que l'hypothèse de la cascade amyloïde est globalement acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique et par le fait qu'il n'existe pas de FAD induite par une mutation du gène de la protéine Tau.

- **hTAU**

Ces modèles sont basés sur l'apport du gène humain de la protéine Tau non mutée sous le contrôle d'un promoteur fort afin de faire surexprimer cette protéine. Il existe des modèles avec l'isoforme 4R ou l'isoforme 3R (Andorfer et al., 2003)(Spittaels et al., 1999)(Ishihara et al., 1999). L'ensemble de ces modèles présentent une hyperphosphorylation de la protéine Tau. Des fibrilles sont également observées sur les modèles entrainant une augmentation du ratio Tau 3R / Tau 4R (Andorfer et al., 2003) (Ishihara et al., 1999). En revanche, chez ce type de modèle, une perte neuronale importante est constatée au niveau de la moelle épinière, ce qui se traduit par de gros déficits moteurs et des atrophies musculaires dont l'intensité est directement liée au niveau d'expression du transgène (en fonction du promoteur utilisé). Des déficits de mémoire ont néanmoins été décrits dans un test de navigation spatiale à partir de 12 mois (Andorfer et al., 2003).

- **Tau muté**

Ces modèles de tauopathie sont basés sur l'apport du gène tau humain contenant une mutation responsable de FTDP (Frontotemporal dementia with parkinsonism).

- JNPL3 : Souris exprimant la protéine Tau 4R avec la mutation P301L et sous le contrôle du promoteur PrP (Götz et al., 2001b). La formation d'enchevêtrements neurofibrillaires de protéine Tau hyperphosphorylée (NFT) ainsi que des neurones en dégénérescence neurofibrillaire (DNF) sont observés dans ce modèle à partir de quatre à cinq mois (Lewis et al., 2000). Ces NFT s'étendent progressivement dans tout le cerveau et sont corrélés avec des déficits de mémoire dans des tests de navigation spatiale. En revanche, ces NFT ne suivent pas l'ordre d'apparition rencontré dans la MA (Ramsden et al., 2005) et ces souris présentent d'importants troubles moteurs liés à une atteinte de la moelle épinière (Lewis et al., 2000). Il existe une variante de ce modèle avec la mutation P301S qui présente des résultats similaires avec l'apparition de NFT à partir de six mois et un début d'atrophie de l'hippocampe à un an (Yoshiyama et al., 2007).

- Tg4510 : Ce modèle est très proche de la lignée JNPL3 (mutation P301L) excepté qu'il a été construit avec un promoteur inductible (tetracycline inductible) qui permet de couper l'expression du transgène à un moment donné avec l'utilisation de la doxycycline (système Tet-OFF). Ce modèle a permis de mettre en évidence que la progression des NFT, une fois qu'ils sont installés, se fait même après l'arrêt de l'expression du transgène (Spires et al., 2006).

- Thy-Tau22 : Le transgène introduit dans ce modèle présente deux mutations FTDP (P301S et G272V) sur la protéine Tau 4R. Il est sous contrôle du promoteur Thy1.2 qui est plus efficace que le Thy1. Cette surexpression conduit à une tauopathie induite plus rapidement sans pour autant développer de gros troubles moteurs. Les NFT sont observés dès trois mois et présentent la structure typique en PHF (paires de filaments hélicoïdaux). Des déficits de mémoire ont également été observés à partir de deux mois (Schindowski et al., 2006).

2.2.5.3. Modèles basés sur des protéinopathies multiples chez la souris

Afin d'étudier les effets et l'éventuelle synergie qui existent entre les différentes protéines responsables des lésions de la MA, des modèles transgéniques ont été développés dans le but de surexprimer ces différentes protéines.

- **APP/Tau :**

Ces modèles sont construits par croisement de souris Tg2576 avec des souris JNPL3. Des dépôts amyloïdes apparaissent à l'âge de neuf mois. La tauopathie est plus sévère et plus étendue que dans la lignée JNPL3 (Akiyama et al., 2012).

Type	Mutation	Dépôts amyloïdes	NFT	Perte Neuronale	Déficits de mémoire
Souris APP	APP V717F	A partir de 6 mois	Non	Légère	A partir de 6 mois
Souris PS1	PS1 M146V	Non	Non	Non	Non
Souris APP/PS1	APP K670N/M671L PS1 M146V	A partir de 6 mois	Non	Légère	A partir de 3 mois
Souris 5xFAD	APP K670N/M671L+ I716V + V717I PS1 M146L + L286V	A partir de 2 mois	Non	Sévère	A partir de 4 mois
Souris Tau	Tau P301L	Non	Entre 4 et 5 mois	Légère (mais avec troubles moteurs importants)	Entre 4 et 5 mois
Souris APP/PS1/Tau	APP K670N/M671L PS1 M146V Tau P301L	A partir de 6 mois	A partir de 12 mois	Légère	A partir de 2 mois

<u>Tableau 4</u> : Récapitulatif des principaux modèles de souris transgéniques.

- **APP/PS1/Tau :**

Ce sont des modèles triples transgéniques, donc basés sur l'apport de trois transgènes comportant des mutations FAD ou FTDP. Ils se composent du gène codant pour la protéine APP humaine avec la mutation Swedish, du gène KI codant pour la protéine humaine PS1 avec la mutation M146V et du gène codant pour la protéine humaine Tau 4R avec la mutation P301L (Oddo et al., 2003). Une forte augmentation de la production de peptide Aβ1-40 et 1-42 est observée dans ces souris avec apparition de dépôts amyloïdes dans le cortex frontal à partir de six mois et qui s'étendent aux autres zones du cerveau de manière progressive. Les NFT apparaissent seulement à l'âge de 12 mois (Oddo et al., 2003)(Carreras et al., 2013). Des déficits de mémoire de travail et de référence (voir chapitre 3) sont observés dès deux mois avant la formation de toutes lésions (Stevens and Brown, 2015). Ces déficits sont associés à une baisse de la capacité à produire des LTP au niveau de l'hippocampe (Walls et al., 2014). Un des défauts de ce modèle est qu'il n'y a pas de pertes neuronales évidentes au niveau de l'hippocampe et en particulier au niveau de la couche CA1 (Bertoni-Freddari et al., 2008) et que les déficits de mémoires ne semblent pas progressifs (pic d'effet à deux mois : Stevens and Brown, 2015).

- **APP/PS1/Tau/αSyn**

Un modèle transgénique produisant les deux lésions caractéristiques de la MA (neurofibrilles de Tau et dépôts amyloïdes) ainsi que des agrégats de la protéine α synucléine a également été produit. Il a pour but d'étudier les effets éventuels de cette protéine dont les agrégats sont retrouvés dans 50% des cas de MA (MA à corps de Lewy). Ce modèle provient du croisement de la lignée triple transgénique (APP/PS1/Tau) avec une lignée exprimant le gène de l'α synucléine humaine comportant une mutation retrouvée dans des formes héréditaire de la maladie de Parkinson (mutation A53T). L'auteur décrit dans ce modèle, une amplification du nombre d'agrégats d'α synucléine par rapport à la lignée α-syn, ainsi qu'une amplification du nombre d'agrégats de protéine Tau de peptide Aβ par rapport à la lignée APP/PS1/Tau. Ce modèle montre également des déficits de mémoire dès l'âge de deux mois (Clinton et al., 2010).

2.2.5.4. Modèles de rats transgéniques

Les modèles de rats transgéniques ont été développés de manière plus tardive que les souris transgéniques et sont relativement peu nombreux. Cela vient notamment du fait que les injections de transgènes sont plus délicates à réaliser dans la cellule pro-nucléaire chez cette espèce et que les embryons présentent un taux de survie plus faible que celui des souris après manipulation (Charreau et al., 1996). Pourtant cette espèce présente des avantages par rapport à la souris comme notamment le fait qu'elle possède les six isoformes de la protéine Tau retrouvées chez l'Homme (Hanes et al., 2009) et que contrairement à la souris, le développement de son cerveau se poursuit après la naissance (Whishaw et al., 2001).

- **Basés sur une surexpression de la protéine APP** :

Plusieurs lignées existent avec l'introduction du gène codant pour la protéine APP humaine avec une ou plusieurs mutations FAD. Par exemple la lignée UKUR28 qui exprime le gène de l'APP avec les mutations Swedish et Indiana sous contrôle du promoteur PDGF (Echeverria et al., 2004a) ou la lignée Mc Gill-R-Thy1-APP qui exprime le même gène que la précédente mais sous le contrôle d'un promoteur plus fort : le Thy1.2 murin (Heggland et al., 2015). La première lignée ne présente pas de dépôts amyloïdes mais seulement une augmentation intracellulaire de peptide Aβ constatée à six mois (Echeverria et al., 2004a) et associée à un déclin cognitif et à une diminution de la formation des LTP (Echeverria et al., 2004b). En revanche, la seconde lignée présente des dépôts amyloïdes observés dans la région hippocampique à partir de neuf mois post-natal (Heggland et al., 2015), ce qui souligne l'importance du promoteur utilisé.

- **Basés sur une surexpression de la protéine APP et PS1 :**

La lignée UKUR25 présente les mêmes types de lésions que la lignée UKUR28, c'est-à-dire une augmentation de peptide Aβ intracellulaire mais sans la formation de dépôts amyloïdes. En revanche, une hyperphosphorylation de la protéine Tau endogène a été observée mais sans aller jusqu'au stade de NFT (Lopez et al., 2004)(Echeverria et al., 2004b). Cette lignée a été développée par le croisement de la lignée UKUR28 avec la ligné UKUR19 qui contient le gène de la PS1 humaine avec la mutation M146L (Echeverria et al., 2004a). A l'inverse, il existe une lignée APP/PS1 présentant des dépôts amyloïdes. Il s'agit de la lignée TgF344-AD qui exprime le gène de l'APP humaine avec la mutation Swedish et le gène de la PS1 humaine avec la mutation ΔE9 (déplétion de l'exon 9) sous contrôle du promoteur PrP. Une augmentation de peptide Aβ soluble oligomérique est observée à l'âge de six mois chez ces rats mais sans déficits cognitifs. Les troubles de mémoire apparaissent plus tardivement (16 mois) avec l'apparition des dépôts amyloïdes, d'une perte de neurones et d'une hyperphosphorylation (sans NFT) de la protéine Tau (Cohen et al., 2013).

- **Basés sur une surexpression de la protéine Tau :**

Il existe également une lignée de rats surexprimant la protéine Tau humaine contenant la mutation P301L sous le contrôle du promoteur PrP (Korhonen et al., 2011). Cette lignée présente une augmentation de la concentration en protéine Tau hyperphosphorylée dans le cerveau en fonction de l'âge. En revanche, contrairement à la lignée de souris homologue (lignée JNPL3), il n'y a pas de NFT, ni de perte neuronale ou de déclin cognitif observés chez ces rats.

2.2.6. Par transfert de gène

Plus récemment, une nouvelle approche est apparue dans le développement de modèles animaux de la MA. Elle consiste, comme dans un modèle transgénique, à faire surexprimer une protéine humaine mutée ou non par transfert de gène. Cependant, contrairement à un modèle transgénique, le gène est ici apporté par injection d'un vecteur viral porteur du gène d'intérêt chez un animal. Cette technique permet de cibler une zone particulière du cerveau à un temps donné au cours de la vie de l'animal.

Les vecteurs viraux utilisés sont soit des lentivirus (rétrovirus), soit des AAV (Adeno-Associated Virus). Les AAV présentent l'avantage de ne pas modifier le génome des cellules transfectées car le gène qu'ils apportent reste sous forme d'un épisome non intégré (McCown, 2011)(Dayton et al., 2012a).

De plus, ces virus sont plus « sûrs » car il n'existe aucune maladie infectieuse humaine liée à ces virus (Berns and Linden, 1995). Dans la modélisation de la MA, plusieurs essais ont été réalisés en intégrant divers gènes suite à des injections réalisées généralement directement au sein de l'hippocampe ou dans une autre structure du système limbique.

- Lentivirus porteur du gène tau humain muté ou sauvage :

L'apport de ce gène entraine une expression puis une hyperphosphorylation de la protéine Tau humaine dans la zone d'injection quelque soit la forme du gène apporté (3R, 4R, P301L). Le niveau de Tau phosphorylée semble néanmoins plus important avec le gène Tau P301L qu'avec la forme sauvage 4R. Cette hyperphosphorylation de la protéine Tau est associée à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires (Dargahi et al., 2011). Injecté dans l'hippocampe de rat adulte, il est constaté une perte neuronale progressive avec la formation de « ghost tangle » ainsi que des neurites dystrophiques contenant la protéine Tau sous forme fibrillaire observée en microscopie électronique (Caillierez et al., 2013). Une autre étude a montré que chez la souris, l'injection d'un lentivirus contenant le gène de la protéine Tau P301S induit la formation de NFT seulement chez des souris transgéniques APP mutée alors que chez des souris wt, la protéine Tau produite est hyperphosphorylée mais reste sous forme non agrégée (Osinde et al., 2008).

- Lentivirus – Aβ1-42 :

L'injection de ce type de virus dans le cortex de rats adultes produit une forte perte neuronale liée à une accumulation de peptide Aβ intracellulaire. Aucun dépôt amyloïde extracellulaire n'est constaté dans ce modèle qui présente en revanche, une hyperphosphorylation de la protéine Tau endogène ainsi qu'une neuro-inflammation (Rebeck et al., 2010).

- AAV – Tau wt 4R ou mutée :

Il a été décrit chez la souris, une forte perte des neurones pyramidaux après une injection de ces virus (tau wt 4R ou P301L) au niveau de l'hippocampe. Cette neurotoxicité s'accompagne d'une forte réaction microgliale et astrocytaire (Jaworski et al., 2010)(Jaworski et al., 2011). Des études ont également été réalisées chez le rat avec des injections de ce type d'AAV dans plusieurs structures du système limbique. Une injection dans le cortex entorhinal d'un AAV-Tau P301L entraine une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine Tau associée à des déficits de la mémoire de travail (Ramirez et al., 2011). La formation de NFT est également observée par exemple au niveau de l'hippocampe après une injection de ce vecteur dans le septum médiale. Ces lésions sont persistantes dans le temps car elles sont retrouvées après huit mois post-injection (Klein et al., 2004). En revanche, l'injection d'un AAV contenant le gène tau wt ne semble pas induire les lésions de type NFT, ni de déficit cognitifs (Dayton et al., 2012b).

- AAV – APP mutée ou Aβ :

Des AAV ont également servi à la transfection du gène de l'APP présentant la mutation Swedish ou d'un gène codant pour la protéine de fusion BRI-Aβ1-40 ou BRI-Aβ1-42. Une fois injecté au sein de l'hippocampe chez le rat, le vecteur AAV-APP muté ne donne aucune augmentation de la charge amyloïde et aucun déficit dans une batterie de tests de mémoire. Par contre, des dépôts amyloïdes sont observés après l'injection du vecteur AAV-BRI-Aβ1-42 mais pas avec l'AAV-BRI-Aβ1-40.

Ces deux types de peptide Aβ induisent des déficits cognitifs divers (avec ou sans dépôts) qui seraient plus marqués en cas d'injection du mélange de ces deux AAV (Lawlor et al., 2007).

- Autres :

D'autres protéinopathies peuvent être reproduites avec cette technique, comme par exemple une surexpression de la protéine TDP43 par un vecteur AAV injecté au sein de l'hippocampe chez le rat qui provoque une perte neuronale et des déficits de mémoire plus importants (Dayton et al., 2012b).

2.3. Avantages et inconvénients des différents modèles

Modèles naturels :

L'avantage principal de ces modèles est qu'ils reproduisent une MA sporadique (98% des cas de MA) car ils ne sont pas basés sur des mutations FAD, contrairement aux modèles transgéniques, et qu'ils présentent une surcharge amyloïde progressive apparaissant sur des sujets âgés, contrairement aux modèles par injections d'Aβ. Cette caractéristique permet d'étudier, par exemple, l'incidence de différents facteurs de risque sur cette pathologie (Braidy et al., 2015). En revanche, un des problèmes majeurs de ces modèles provient du coût qu'ils représentent : il faut attendre plusieurs années avant qu'ils développent une pathologie qui ne concernera qu'un faible pourcentage d'individus. De plus, ils concernent souvent des animaux domestiques (comme le chien) ou des primates non-humains, ce qui pose des problèmes d'ordre éthique. Un autre inconvénient est qu'il existe peu d'articles sur un même modèle donc peu d'informations sont disponibles et elles sont parfois basées sur des observations qui ont été réalisées sur un petit nombre d'individus et n'ont pas été reproduites (Bons et al., 2006). Pour finir, il n'existe pas, à ce jour, de modèles naturels reproduisant la tauopathie et sa propagation spatio-temporelle spécifique à la MA.

Modèles par injections d'agents pharmacologiques :

Ces modèles sont faciles à mettre en œuvre. Ils permettent d'étudier certains aspects de la maladie. Par contre, ils ne reproduisent pas, ou que partiellement, les deux lésions caractéristiques de la MA (dépôts amyloïdes et TNF). Par conséquent, ces modèles sont relativement éloignés de la pathologie.

Modèles par injection de peptide Aβ :

L'injection de peptide Aβ présente l'avantage de reproduire les lésions de type amyloïde de la MA avec leurs effets associés (inflammation, perte neuronale…). C'est une méthode rapide et peu couteuse permettant également de cibler une zone du cerveau.

Le problème majeur de cette méthode est qu'il n'existe pas de protocole standard pour produire un modèle de MA qui serait utilisé par l'ensemble des équipes de recherche. Globalement, il existe un protocole spécifique à chaque équipe. Les différents paramètres qui peuvent varier sont les suivants :

- Taille du peptide injecté.
- Forme soluble ou agrégé.

- Protocole d'agrégation utilisé : temps d'incubation, température d'incubation, véhicule utilisé… (Dahlgren et al., 2002).
- Coordonnées stéréotaxiques qui varient pour léser une même zone du cerveau.
- Test de mémoire utilisé.
- Souche de rongeurs utilisée (exemple chez le rat : Wistar, Sprague Dawley, Long Evans…)

Un autre inconvénient de ces modèles est qu'ils ne reproduisent pas de tauopathie et qu'ils ne sont pas progressifs contrairement à la MA.

Modèles transgéniques :

Les modèles de souris transgéniques ont permis de réaliser d'importantes avancées dans la compréhension de la MA avec notamment l'identification du rôle des différentes mutations impliquées dans les FAD. Cependant, ces modèles présentent plusieurs inconvénients :

- Ils sont basés sur une surproduction de protéine humaine or toute accumulation importante de protéine devient toxique pour les cellules (Elder et al., 2010).
- Une surproduction de la protéine APP n'existe pas dans la MA, or cette surproduction peut influencer d'autres fonctions biologiques, le rôle de la protéine APP étant mal connu à ce jour (Puzzo et al., 2015).
- Les gènes humains utilisés présentent des mutations issues de FAD, or les FAD ne représentent que 2% des cas de MA (www.inserm.fr).
- Globalement, peu de mort neuronale est observée dans ces modèles sauf avec ceux qui comportent plusieurs mutations FAD. Or, chez l'Homme, il n'existe pas de cas avec plusieurs mutations (Elder et al., 2010).
- Les pertes de neurones observées ne touchent que très peu l'hippocampe qui est pourtant une des zones les plus vulnérables dans la MA (Oakley et al., 2006).
- Les modèles APP ou PS1 avec une seule mutation ne présentent généralement pas de dépôts amyloïdes. Chez l'Homme, une seule de ces mutations suffit à entrainer une accumulation de ces dépôts de manière précoce ce qui laisse supposer que les mécanismes d'agrégations ne sont pas identiques (Elder et al., 2010).
- Il existe peu de modèles présentant une tauopathie qui est pourtant présente dans tous les cas de MA. De plus, dans les modèles développant des NFT, ces lésions ne suivent pas la progression spatio-temporelle spécifique à la MA et présentent de fortes lésions de la moelle épinière (Jaworski et al., 2010)(Caillierez et al., 2013)(Ramsden et al., 2005).

L'ensemble des divergences rencontrées entre ces modèles et la maladie humaine peuvent expliquer l'échec de plusieurs essais de thérapies lors de leur passage en phase clinique, alors que ces résultats semblaient probants sur ces modèles. C'est notamment le cas de plusieurs essais de vaccination dirigés contre les agrégats de peptides Aβ (Franco and Cedazo-Minguez, 2014).

Il existe une multitude de modèles transgéniques basées sur une combinaison de différentes mutations et de promoteurs différents (plus d'une centaine recensée sur le site www.alzforum.org). L'ensemble de ces combinaisons constitue une véritable « jungle » pour le choix d'un modèle et rend les comparaisons entres différentes études compliquées voir impossibles. De plus, le temps nécessaire à l'apparition des lésions (parfois supérieur à un an) peut être un inconvénient pour l'industrie pharmaceutique.

Modèle :	Présence des deux lésions (Dépôts et TNF)	Respect de la progression spécifique des TNF	Neuro-inflammation	Deficits cognitifs	Autres
Naturels	Oui (microcèbe et octodon)	Non	Oui	Oui	Attente de plusieurs années. Effectif faible développant les lésions.
Agents pharmacologiques	Non	Non	ND	Oui	Eloignés de la MA. Nécessite une chirurgie dans certains cas.
Injection d'Aβ	Non	NA	Oui	Oui	Nécessite une chirurgie. Non progressif.
Transgéniques	Oui (pour APP/PS1/Tau)	Non	Oui	Oui	Attente (parfois 1 an). Basé sur des FAD. Prix des animaux. APP/PS1/Tau disponible que chez la souris.
Transfert de gènes	Non	Oui	Oui	Oui	Nécessite une chirurgie.

<u>Tableau 5</u> : Récapitulatif des différents modèles animaux de la MA.

ND : Non Documenté ; NA : Non Applicable

Les modèles de rats transgéniques sont quant à eux, peu nombreux et présentent des amyloïdopathies moins marquées et encore plus longues à se mettre en place en comparaison avec les lignées de souris transgéniques homologues (Do Carmo and Cuello, 2013).

Modèles par transfert de gène :

L'avantage principal de cette technique est de pouvoir cibler à un temps donné, une région particulière du cerveau sans toucher les structures alentours (contrairement aux modèles transgéniques). Cet avantage présente un intérêt particulier pour modéliser la MA dont les lésions commencent à se développer à proximité de l'hippocampe.

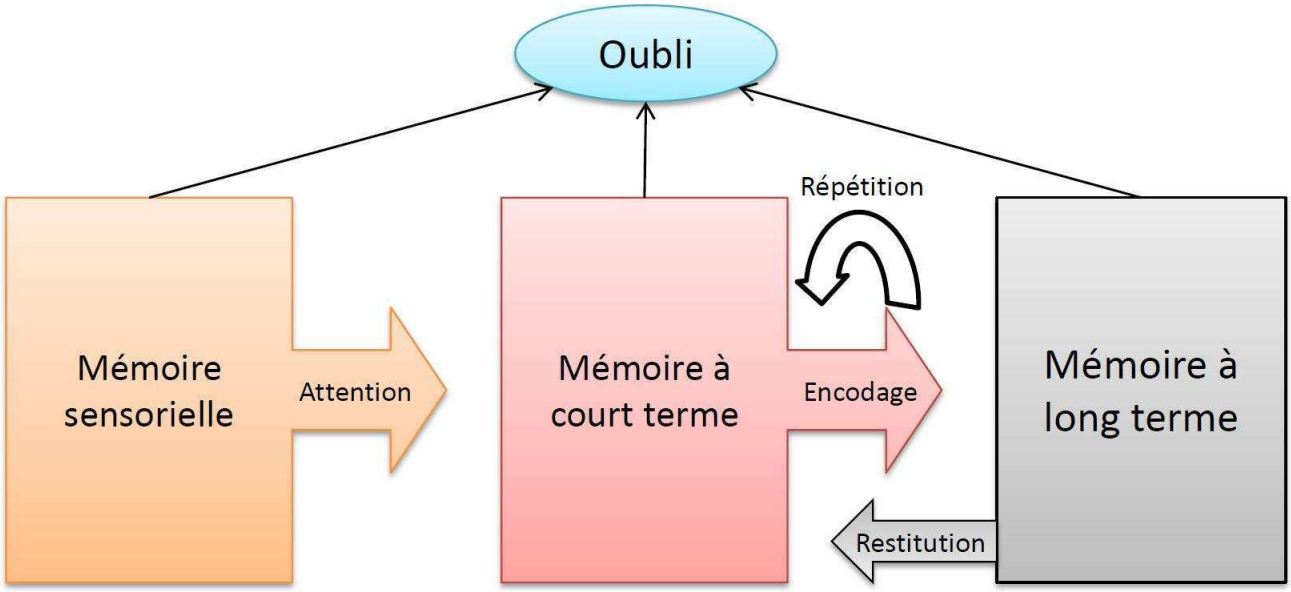
Un des inconvénients de l'utilisation de vecteurs viraux est que la taille du transgène est limitée. Le génome d'un AAV est d'environ 5 kb, ce qui permet d'insérer un gène d'environ 3,9 kb seulement, après l'introduction de tous les éléments nécessaires à sa transcription (Shevtsova et al., 2005). Un autre défaut de ces modèles est qu'ils sont relativement récents et donc qu'il existe peu de données sur les effets d'un de ces types de vecteurs recombinants. De plus, il existe une variété de différents sérotypes d'AAV qui présentent des tropismes différents pour les neurones. L'utilisation de ces différents sérotypes combinés à différents types de promoteurs plus ou moins forts rend les comparaisons entre les modèles par transfert de gène compliquées.

2.4. Choix du modèle :

Il n'existe aucun modèle de la MA développant les dépôts amyloïdes ainsi qu'une tauopathie en respectant la progression de la maladie. De plus, les modèles actuels développant les dépôts et les NFT sont des modèles transgéniques (à l'exception de l'octodon et du microcèbe) donc relativement éloignés d'une MA sporadique et ne sont disponibles que chez la souris (**tableau 5**).

Nous avons donc choisi de développer un nouveau modèle de la MA en combinant la technique de transfert de gène avec l'injection de peptide Aβ. Une injection concomitante de peptide Aβ42 (forme la plus amyloïdogénique, Barrow et al., 1992), et d'un AAV codant pour le gène de la protéine Tau P301L au sein de l'hippocampe doit permettre de reproduire les dépôts amyloïdes ainsi qu'une tauopathie en respectant la zone du cerveau atteinte dans les stades précoces de la MA.

Pour le développement de notre modèle animal de MA, nous avons choisi le rat car cette espèce présente plusieurs avantages par rapport à la souris. Le rat est plus proche de l'Homme d'un point de vue génétique (Lin, 1995)(Jacob and Kwitek, 2002)(Gibbs et al., 2004). Sa plus grande taille facilite également les chirurgies et notamment les injections intracérébrales et il présente une meilleure aptitude à réaliser les tests de navigation spatiale que la souris (Whishaw et al., 2001).



<u>Figure 20</u> : Les différents types de mémoire.

Schéma adapté du modèle d'Atkinson et Shiffrin (Atkinson and Shiffrin, 1971).

3. Evaluation de la mémoire chez les modèles animaux de la MA

3.1. Généralité sur la mémoire en expérimentation animale

3.1.1. Les différents types de mémoire

La mémoire peut être divisée en deux grandes catégories en fonction de sa durée de stockage : la mémoire à court terme et la mémoire à long terme (**figure 20**). Selon le modèle d'Atkinson et Shiffrin (Atkinson and Shiffrin, 1971), la mémoire à court terme permet le stockage pendant une courte période d'informations provenant du monde extérieur via les organes sensoriels. En fonction de leur répétition et/ou d'un certain niveau d'attention, ces informations peuvent être soit « perdues », soit encodées vers un système de mémoire à long terme avec une durée pouvant être illimitée.

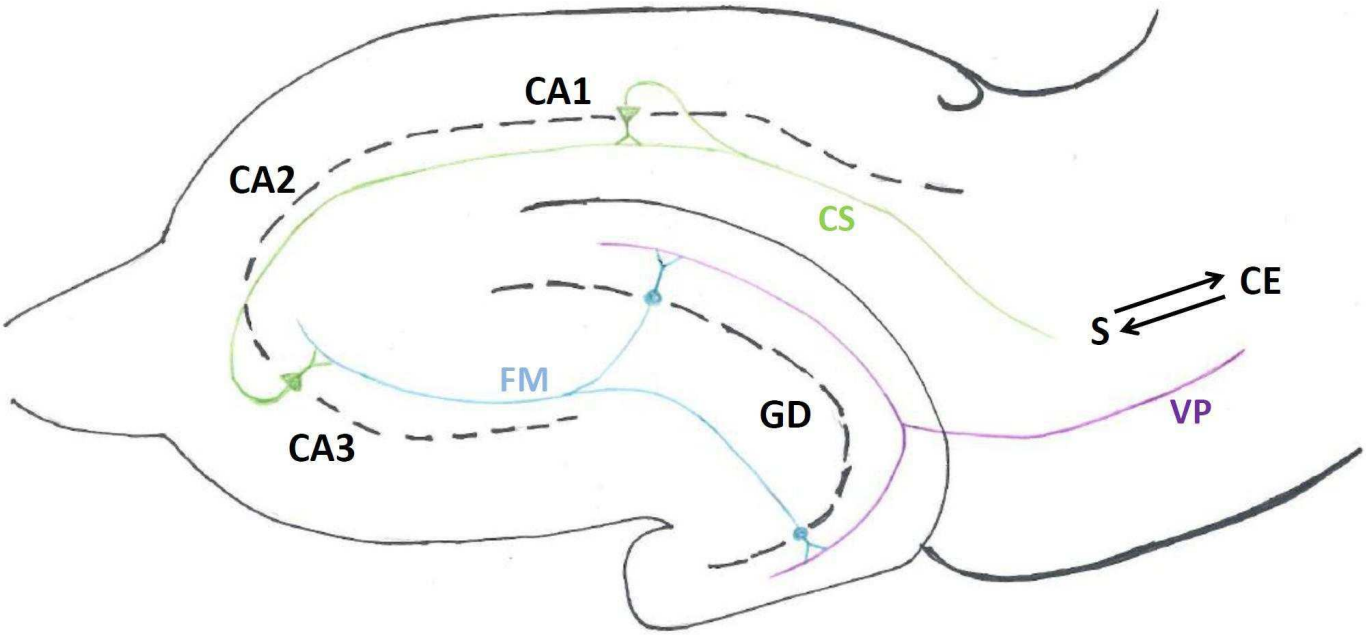
Suivant le modèle de Cohen et Squire (Cohen and Squire, 1980), la mémoire à long terme se subdivise également en deux catégories :

- La mémoire déclarative ou explicite dont la restitution des informations peut se faire de manière consciente. Elle se compose de la mémoire épisodique faisant référence au souvenir d'événements vécus, et de la mémoire sémantique qui concerne le savoir comme par exemple une règle de grammaire (Tulving, 1987).
- La mémoire non déclarative ou implicite dont la restitution des informations se fait de manière inconsciente. Il s'agit du stockage et de l'acquisition des gestes répétitifs, des « savoir-faire » (par exemple faire du vélo). Ce type de mémoire porte également le nom de mémoire procédurale (Tulving, 1987).

Il existe également un autre type de mémoire proche de la mémoire à court terme, rencontré régulièrement dans la littérature et appelé mémoire de travail. Il s'agit d'un concept théorique énoncé par Alan Baddeley en 1986 (source : Baddeley, 1992). Elle se situe, comme la mémoire à court terme, entre l'information sensorielle et la mémoire à long terme. Elle constitue un espace de stockage temporaire et limité où des informations provenant de sources diverses (organes sensoriels, mémoires procédurales, épisodique…) peuvent y être maintenues et manipulées afin de produire une action pendant la réalisation de tâches cognitives diverses. L'exécution normale de la mémoire de travail serait atteinte dans la MA (Baddeley, 1992).

3.1.2. Les différents types de mémoire en expérimentation animale

En expérimentation animale, les termes les plus fréquemment utilisés sont la mémoire de travail et la mémoire de référence. La mémoire de travail désigne la capacité d'un animal à réaliser une action dont le but change dans le temps, par exemple, retrouver une plateforme dont la position est régulièrement changée dans un test de navigation spatiale.



<u>Figure 21</u> : Schéma représentatif de la boucle trisynaptique formée par l'hippocampe.

CA : Corne d'Ammon.
CE : Cortex Entorhinal.
GD : Gyrus Denté.
S : Subiculum.
CS : Collatéral de Shaffer.
FM : Fibres Moussues.
VP : Voie Perforante.

Schéma adapté de la boucle trisynaptique de Stepan (Stepan et al., 2015).

La mémoire de référence désigne quant à elle, la capacité d'un animal à réaliser une action constante dans le temps suite à un apprentissage, par exemple, retrouver une plateforme dont la position est fixe (Timofeeva et al., 2010). D'une manière plus générale, la mémoire de travail représente un type de mémoire à court terme et la mémoire de référence représente un type de mémoire à long terme (Kay et al., 2010). Ainsi, la mémoire de travail peut être évaluée sur des tests effectués au sein de courtes périodes (par exemple des erreurs commises au sein d'un même test ou entre deux tests successifs) et la mémoire de référence peut être évaluée à la suite d'un apprentissage, après une période suffisament longue pour nécessiter la mise en place d'un stockage à long terme : rétention de l'information (Trinchese et al., 2004)(Alamed et al., 2006).

Les termes de mémoire spatiale ou mémoire non spatiale sont également retrouvés. Ils font référence au test de mémoire utilisé : test de navigation spatiale ou non spatiale (Bryan et al., 2009). Les tests de navigation spatiale sont considérés comme les plus spécifiques de l'hippocampe (West, 1993).

3.1.3. Rôle de l'hippocampe dans la mémorisation

3.1.3.1. Anatomie de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure du cerveau appartenant au système limbique. Il correspond à un repliement de structures sous-corticales situées au niveau du lobe temporal inférieur dans sa partie médiale. Il est composé de différentes couches de neurones connectés entre eux et formant deux régions distinctes donnant l'aspect de deux U inversés en coupe transversale (**figure 21**). Il s'agit de la corne d'Ammon et du gyrus denté. La corne d'Ammon (en référence au dieu Egyptien de part sa forme en U) se divise en trois parties (CA1, CA2 et CA3) en raison de différences morphologiques des neurones et des synapses qui la composent. Les neurones de la corne d'Ammon sont principalement des neurones pyramidaux, reliés entre eux par leurs projections formant la fibre collatérale de Shaffer. Le gyrus denté est quant à lui composé de neurones granuleux connectés à la région CA3 par leur projections appelées fibres moussues.

L'hippocampe forme une boucle trisynaptique glutamatergique et unidirectionnelle (Stepan et al., 2015 ; **figure 21**). L'entrée de l'influx nerveux se fait au niveau du gyrus denté par la voie perforante formée par les projections des neurones pyramidaux du cortex entorhinal, puis suit la voie des fibres moussues et de la fibre collatérale de Shaffer à travers la corne d'Ammon, et sort de l'hippocampe par les projections des neurones de la région CA1 vers le subiculum, lui-même connecté au cortex entorhinal. Dans cette boucle, la principale communication de l'hippocampe avec les autres régions du cerveau se fait via le cortex entorhinal qui sert de « relais » entre le néocortex et les autres structures du système limbique : amygdale, noyau basal de Meynert, thalamus… (Bliss and Collingridge, 1993)(Small et al., 2011).

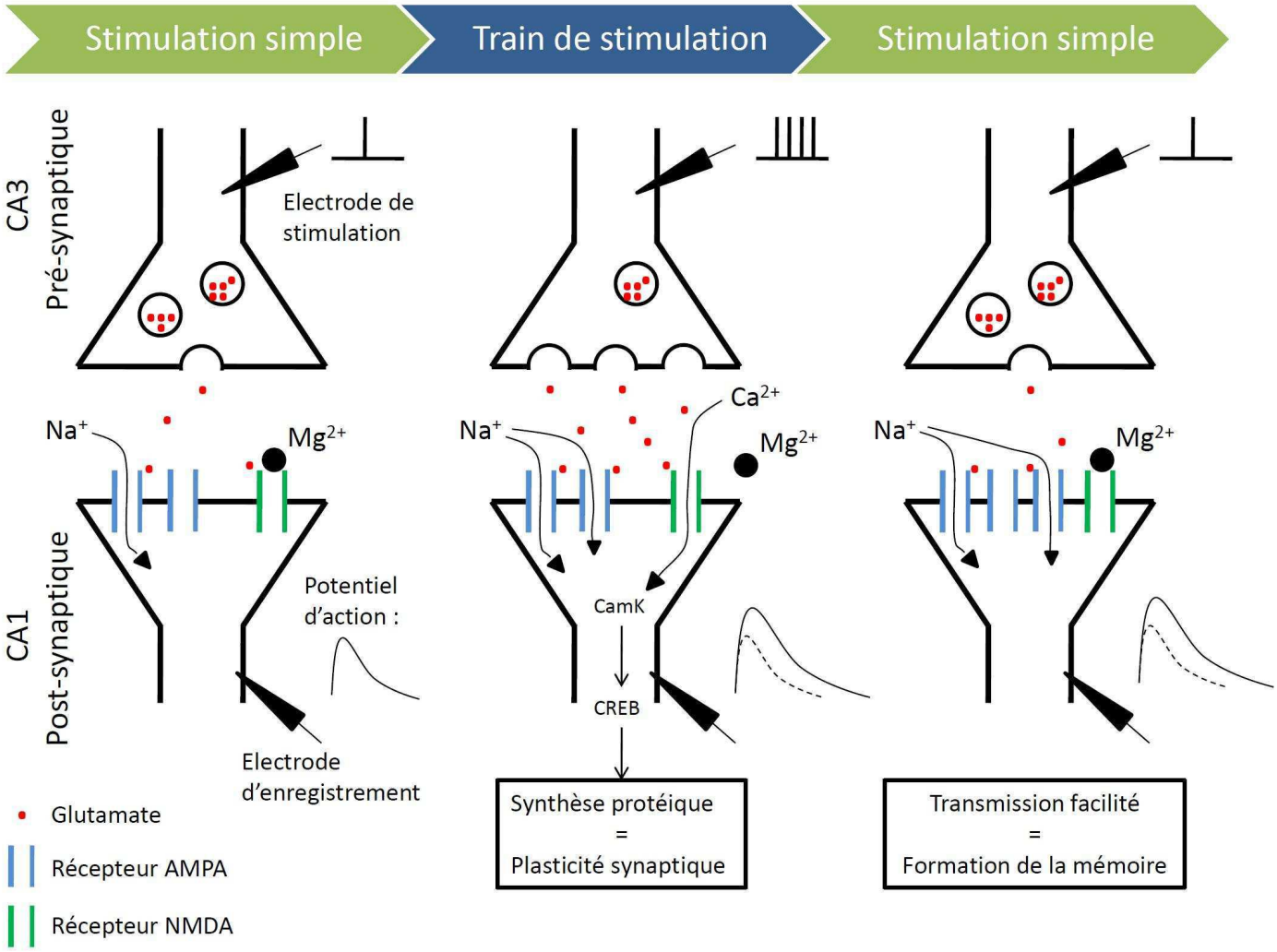
3.1.3.2. Lien entre hippocampe et mémoire

L'hippocampe est considéré comme ayant un rôle majeur dans la formation de la mémoire (apprentissage), l'orientation spatiale et le stockage d'informations récentes (mémoire épisodique des faits récents) avant un encodage à long terme au niveau du néocortex (Squire et al., 2004).

Cette considération s'est d'abord basée sur des observations faites sur des personnes ayant subi des lésions de l'hippocampe. Par exemple, les premières recherches menées sur l'hippocampe et son rôle sur la mémoire ont eu lieu dans les années 50 où des patients ayant subi une résection partielle de l'hippocampe (initialement traités pour des troubles schizophréniques ou épileptiques) présentaient de forts troubles de mémoire. D'après les recherches de Scoville et Milner (Scoville and Milner, 1957), une ablation bilatérale de la partie antérieure de l'hippocampe conduit à une amnésie antérograde se manifestant par une incapacité d'apprentissage et à un oubli de faits récents antérieurs à la chirurgie (mémoire épisodique), sans pour autant toucher au quotient intellectuel du patient. Ces troubles de mémoire sont corrélés avec la taille de l'ablation réalisée et sont spécifiques de l'hippocampe car lorsqu'une ablation d'une structure proche de l'hippocampe est réalisée (amygdale, cortex temporal), ils ne constatent aucun changement au niveau de la mémoire. Une autre étude a montré que chez des patients ayant également subi une ablation totale mais unilatérale de l'hippocampe pour le traitement d'épilepsies sévères, d'importants déficits de mémoire et d'apprentissage spatial dans un test de navigation spatial virtuel sont constatés. En revanche, ces déficits ne sont pas présents chez des patients ayant subit une ablation partielle du lobe temporal après le retrait d'une tumeur (Astur et al., 2002). Grâce aux techniques d'imageries par résonnance magnétique ou de PET-Scan, une diminution du volume de l'hippocampe ou de son métabolisme a pu être corrélée avec des troubles de la mémoire rencontrés de manière physiologique chez les personnes âgées (Raz et al., 2010) mais également chez des patients atteint de MCI avant une conversion en démence de type Alzheimer (Whitwell et al., 2007).

Plusieurs études avec lésions de l'hippocampe réalisées sur le rongeur conduisent également aux mêmes conclusions. Par exemple, la destruction de l'hippocampe par injection d'une toxine ou l'application d'un choc électrique chez le rat, montre des perturbations dans un test de navigation spatiale (Sutherland and McDonald, 1990), ou un sévère déficit de mémoire de travail dans un test d'alternance spontanée (Aggleton et al., 1989) ou de labyrinthe radial (Becker et al., 1980), ce qui n'est pas retrouvé lors de l'atteinte des autres régions du système limbique. Plus précisément, Stepanichev (Stepanichev et al., 2006) a montré que les déficits observés lors des tests de mémoire spatiale sont corrélés avec des changements morphologiques de la région CA1 de l'hippocampe après une injection de peptide Aβ chez le rat. Lors d'une destruction ciblée de ces neurones, par exemple avec un système FLEX-CRE chez la souris permettant de n'exprimer une toxine que dans les neurones CA1, des auteurs ont mis en évidence un déficit de mémoire touchant seulement la mémoire de travail et non la mémoire de référence (Murray et al., 2011), ce qui est compatible avec les observations réalisées chez l'Homme lors de lésions de l'hippocampe : trouble d'apprentissage et perte des faits récents.

Au niveau de la maladie d'Alzheimer, les premiers signes cliniques correspondant à des troubles de la mémoire sont de même type que les symptômes observés lors des lésions de l'hippocampe : troubles d'orientation, d'apprentissage et des faits récents (Hodges, 1998)(Soto et al., 2007).



<u>Figure 22</u> : Schéma représentatif de l'induction de la LTP et de ses mécanismes.

Un train de stimulation électrique permet d'induire une LTP. La transmission synaptique enregistrée se fait alors avec une plus forte amplitude après une simple stimulation.

Ces troubles apparaissent pendant les stades d'atteintes du système limbique (stade III et IV) où l'hippocampe est particulièrement touché (Braak and Braak, 1997).

3.1.3.3. La potentialisation à long terme

D'autres types de recherches au niveau de l'hippocampe permettent de faire le lien entre cette structure et la mémoire. Elles sont basées sur une des propriétés communes aux trois voies de communication de l'hippocampe (voir boucle trisynaptique : **figure 21**). Elle peut se définir comme la capacité à faciliter le passage d'un potentiel d'action d'une voie à l'autre en cas de stimulation répétée. Cette propriété est appelée potentialisation à long terme (LTP). C'est un phénomène de plasticité synaptique considéré comme étant à la base de la formation de la mémoire (Small et al., 2011).

La LTP peut être induite en stimulant avec une électrode une région de l'hippocampe (comme le gyrus denté ou CA3) soit *in vitro* sur coupes d'hippocampe maintenues dans un milieu de survie, soit directement *in vivo*. Son induction se fait par une répétition de stimuli électriques à haute fréquence qui est plus efficace quand ces trains de stimulations sont eux-mêmes répétés avec une fréquence correspondant aux rythmes rencontrés naturellement au sein de l'hippocampe pendant un apprentissage. Il s'agit des rythmes thêta oscillant à une fréquence de 4 à 8 Hz (Hernandez et al., 2005)(Larson et al., 2012). La transmission synaptique est alors enregistrée au niveau d'une région de l'hippocampe située en aval de la région stimulée : il s'agit souvent de la région CA1. La LTP est visualisée lorsque la transmission synaptique enregistrée se fait avec une plus forte amplitude après une simple stimulation (Bliss and Lomo, 1973).

Le système principal de neurotransmission impliqué dans la LTP correspond à la transmission glutamatergique. Il fait intervenir principalement les récepteurs post-synaptiques NMDA et AMPA qui sont des récepteurs couplés à des canaux ioniques perméables respectivement aux ions calcium et sodium (Bliss and Collingridge, 1993). Lors de l'induction de la LTP, une quantité de glutamate plus importante est libérée que lors d'une simple stimulation, produisant ainsi une dépolarisation membranaire rapide induite par une entrée massive d'ions sodium à travers les récepteurs AMPA. Cette dépolarisation est nécessaire à l'activation des récepteurs NMDA, en plus de leur interaction avec le glutamate, en déplaçant un bouchon magnésium et permettant ainsi une entrée d'ions calcium dans la cellule (Collingridge et al., 1992). C'est cette augmentation de calcium intracellulaire qui est à l'origine de la plasticité synaptique via l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (en particulier par l'activation de kinases comme les CaMK ou les MAPK et l'augmentation d'AMPc intracellulaire) conduisant à une synthèse protéique contrôlée par le facteur de transcription CREB (Middei et al., 2013), ou par des phénomènes de compaction/décompaction de l'ADN (Konsoula and Barile, 2012). Cette synthèse de protéines va se traduire, par exemple, par une augmentation de récepteurs AMPA à la surface de la synapse ou par une augmentation du nombre de synapses. C'est ce qui explique que la transmission soit ensuite « facilitée » et que ce phénomène soit durable dans le temps : de plusieurs heures à plusieurs jours (**figure 22**). Ce mécanisme est considéré comme étant à la base de la formation d'une mémoire à long terme.

Les LTP ne sont cependant pas spécifiques à l'hippocampe. Elles peuvent être observées dans de nombreuses autres structures du cerveau.

3.1.3.4. Lien entre potentialisation à long terme et mémoire

Plusieurs études ont montré qu'il existe un lien direct entre la capacité de l'hippocampe à former des LTP et la formation de la mémoire. Par exemple, un blocage de la formation de la LTP (enregistré *in vivo)* au sein de l'hippocampe par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs NMDA (infusion intrahippocampique) entraine un déficit d'apprentissage chez le rat. Ce phénomène est observé lors de tests de navigation spatiale considérés comme faisant intervenir l'hippocampe (Morris et al., 1986)(Davis et al., 1992). Plus récemment, grâce à l'utilisation de souris transgéniques, il a été montré que la délétion de récepteurs NMDA dans des régions précises de l'hippocampe entraine des pertes de capacité de formation de la LTP ainsi que des déficits de mémoire. Par exemple, la suppression des récepteurs NMDA au niveau du gyrus denté conduit spécifiquement à des troubles de la mémoire de travail, mais pas de la mémoire de référence (Dillon et al., 2008)(Niewoehner et al., 2007). Il a également été montré que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs cholinergiques, comme la scopolamine, connus pour entrainer des troubles de la mémoire et en particulier de la mémoire de travail (Kay et al., 2010)(Hodges et al., 2009), provoque également une inhibition de la LTP au niveau de l'hippocampe (Portero-Tresserra et al., 2014)(Hornick et al., 2011). A l'inverse, l'utilisation « d'activateur » du système cholinergique, comme par exemple un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, permet de faciliter la formation de LTP sur tranche d'hippocampe *in vitro* et permet de restaurer un déficit de mémoire induit par la scopolamine dans un test de mémoire de travail (Hornick et al., 2011). En revanche, l'activation des circuits cholinergiques au sein de l'hippocampe ne permet pas d'induire une LTP en cas de blocage des récepteur NMDA. Le système cholinergique jouerait donc un rôle dans la régulation de la LTP mais pas dans son mécanisme (Hornick et al., 2011).

Le fait que le système cholinergique, qui est largement présent au sein de l'hippocampe avec en particulier les récepteurs α7 nicotinique (Kawai et al., 2002), intervienne dans la LTP et que ces fibres soient fortement atteintes dans la MA (Timofeeva et al., 2010) suggère que c'est ce système de neurotransmission qui est à l'origine des premiers signes de perte de mémoire rencontrés dans les stades précoces de cette maladie. En effet, des études ont démontré que le peptide Aβ peut inhiber la formation de LTP sur tranches d'hippocampe *in vitro* (Koffie et al., 2011)(Odero et al., 2010) mais aussi *in vivo* chez des modèles de souris transgéniques surexprimant le peptide Aβ. Contrairement à la présence de dépôts amyloïdes, une perte de capacité à former des LTP est corrélée avec des déficits de mémoire (Odero et al., 2010) et en particulier la mémoire de travail (Trinchese et al., 2004), observés dans des tests de navigation spatiale. L'utilisation d'agoniste du récepteur α7 nicotinique (Ondrejcak et al., 2012) ou d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase comme le donépézil (Kapai et al., 2012) permet de restaurer la capacité de LTP de l'hippocampe en présence du peptide Aβ, mais permet également d'améliorer les capacités d'apprentissage chez un modèle de rat Alzheimer dans un test de navigation spatiale (Srivareerat et al., 2011). Des recherches ont également pu mettre en évidence qu'il existe des interactions directes entre le récepteur α7 nicotinique et le peptide Aβ (Garcia-Osta and Alberini, 2009). Mais l'hypothèse que le peptide Aβ inhibe les phénomènes de LTP par une action sur le système de neurotransmission glutamatergique demeure. En effet, le peptide Aβ est connu pour inhiber la recapture du glutamate, or cette inhibition entraine une forte concentration de ce dernier au sein de la fente synaptique, ce qui provoque un afflux massif de calcium dans les neurones post-synaptiques via les récepteurs AMPA et NMDA. Une forte concentration de calcium intracellulaire est toxique pour les cellules et peut donc bloquer la formation de LTP (Li et al., 2009).

Ces différents résultats permettent donc de faire le lien entre modulation des transmissions glutamatergiques par le système cholinergique (altéré par la MA) au sein de l'hippocampe, plasticité synaptique avec la formation des LTP, et formation de la mémoire à long terme (apprentissage).

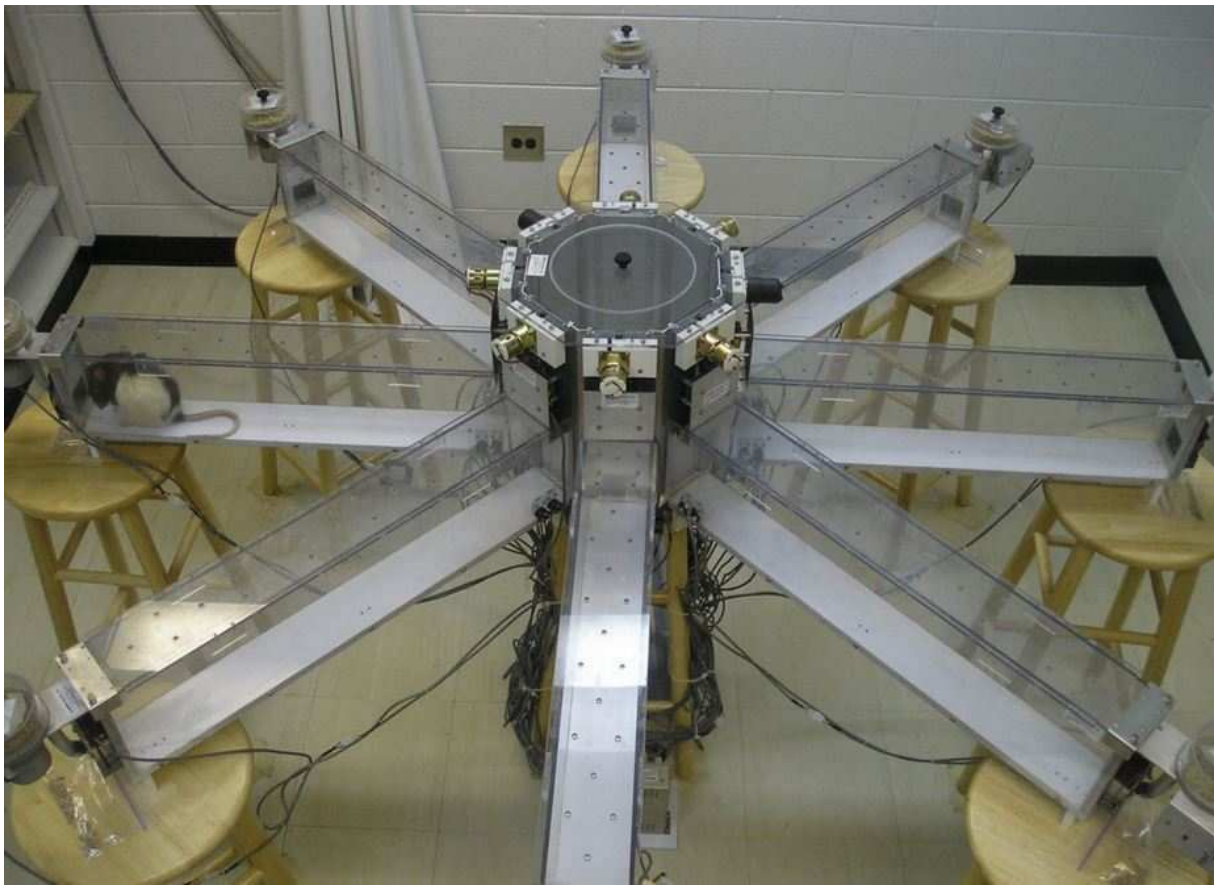
3.1.3.5. L'hippocampe : une cible potentielle pour la modélisation de la maladie d'Alzheimer

Malgré le fait que les lésions présentes dans la MA ne débutent pas directement dans l'hippocampe (voir stade I : Braak and Braak, 1991), l'atteinte de cette structure semble être à l'origine des premiers troubles de mémoires rencontrés chez des patients MCI avant une conversion en démence de type Alzheimer. L'hippocampe est donc une zone qui est particulièrement intéressante à cibler pour la mise au point de modèles animaux de la MA. Dans les expérimentations présentées dans cette thèse, nous avons donc choisi de réaliser l'ensemble des injections de peptide Aβ et d'AAV-tau au sein de l'hippocampe afin notamment de pouvoir évaluer un déficit de mémoire en utilisant un test de navigation spatiale.

3.2. Les principaux tests d'évaluation de la mémoire chez le rongeur

En plus des modèles de mémoire *in vitro* avec la formation de la LTP au niveau de l'hippocampe, il existe plusieurs tests d'évaluation de la mémoire *in vivo* en expérimentation animale. Ils sont basés en général sur des renforcements positifs ou négatifs. Le renforcement constitue un élément de motivation pour l'animal permettant de déclencher un apprentissage dans un test. L'apprentissage correspond à la capacité d'un animal à produire une action adaptée lors d'une tâche donnée. Le renforcement se dit positif quand l'élément de motivation correspond à une récompense (souvent sous forme d'aliment), et négatif quand il s'agit d'éviter une situation aversive. Il existe également des tests ne faisant pas appel à un renforcement en exploitant des comportements naturels des rongeurs (par exemple les tests d'alternance spontanée).

Le choix d'un test de mémoire doit se faire en fonction du type de mémoire étudiée : mémoire de travail ou de référence, spatiale ou non spatiale, mais aussi en fonction d'éventuelles incompatibilités qui peuvent être rencontrées avec certains traitements étudiés. Par exemple, la scopolamine qui a un effet coupe faim est incompatible avec un renforcement basée sur la prise de nourriture. Un des problèmes majeur pour le choix d'un test est qu'il n'existe pas de protocole standard qui serait commun aux différents expérimentateurs. Les protocoles utilisés au sein d'un test (temps entre deux passages, nombre de passage…) sont souvent spécifiques à chaque laboratoire, ce qui rend parfois les comparaisons compliquées voir impossibles.



<u>Figure 23</u> : Photographie d'un Radial Arm Maze à huit bras.

Source : Roberts, 2006.

3.2.1. Les tests à renforcement positif

3.2.1.1. Exploration de la mémoire spatiale

Radial Arm Maze (RAM)

Principe :

Le Radial Arm Maze, ou labyrinthe à bras radiaux (**figure 23**), est constitué généralement de huit bras rayonnant autour d'une pièce centrale circulaire. Il existe des versions avec plus de bras (16 bras : Timofeeva et al., 2010) dans le but d'augmenter la sensibilité du test. L'accès de ces bras est contrôlé par des portes guillotines. Des récompenses alimentaires sont placées à l'extrémité d'un ou plusieurs bras. L'animal est placé dans la pièce centrale du labyrinthe et est laissé libre de choisir un des différents bras après l'ouverture des portes. Les portes sont alors refermées et l'animal est laissé dans le bras pendant une certaine durée, en générale quelques minutes. L'animal est ensuite replacé au centre du labyrinthe et la même procédure est alors appliquée. Le test s'achève après que toutes les récompenses alimentaires aient été trouvées ou après un certain nombre de visites. Le paramètre principalement étudié est le nombre de visites effectuées pour trouver toutes les récompenses alimentaires.

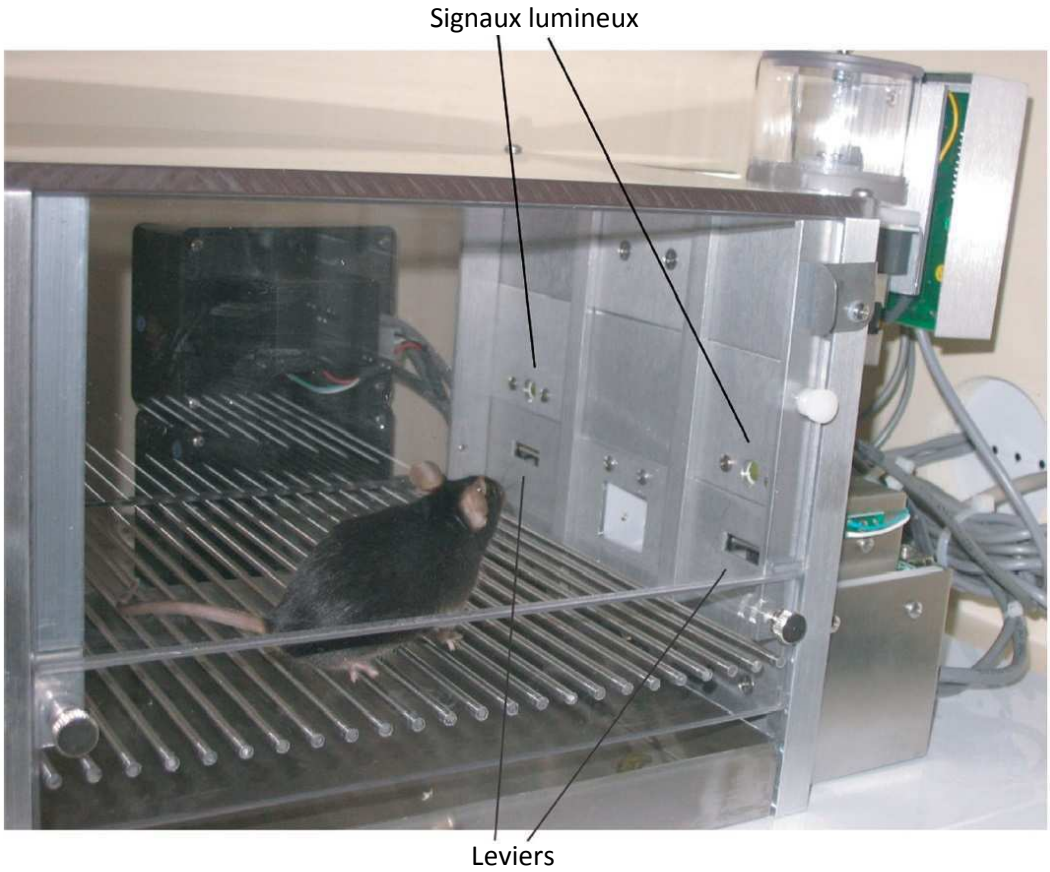
Protocole pour l'étude de la mémoire de travail :

Pour étudier spécifiquement la mémoire de travail, le principe est de récompenser tous les bras du labyrinthe. Les erreurs de type mémoire de travail sont alors évaluées en comptant le nombre d'entrées effectuées par l'animal dans des bras déjà visités au sein d'une même session (réentrée). Le test étant limité à un nombre maximum d'entrées, l'animal est « poussé » à ne pas revisiter des bras pour optimiser le nombre de récompenses qu'il peut obtenir (Coltman et al., 2011) (Timofeeva et al., 2010).

Protocole pour l'étude de la mémoire de travail et de référence :

Il est également possible d'évaluer la mémoire de travail et la mémoire de référence au sein d'un même protocole (Smith et al., 1998). Dans ce cas, seule la visite d'une partie des bras est récompensée (par exemple quatre bras récompensés sur les huit bras dont la position reste inchangée tout au long de plusieurs essais dans le but de produire la formation d'une mémoire de référence chez l'animal). La mémoire de travail est évaluée de la même façon que dans le protocole précédent (nombre de réentrées). En revanche, la mémoire de référence est évaluée en comptant le nombre de bras non récompensés visités (Dillon et al., 2008)(Xu et al., 2009). Dans notre exemple, quatre erreurs de mémoire de référence maximum sont donc possibles lors d'un passage.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Stevens and Brown, 2015) ; modèles non transgéniques (Dillon et al., 2008).



<u>Figure 24</u> : Photographie d'une Operant Chamber.

Source : Malkki et al., 2010.

<u>Figure 25</u> : Photographie d'un Morris Water Maze.

Les quatre cadrans ainsi que la position de la plateforme sont représentés sur l'image de droite.

Sources : Zhang et al., 2014 ; Moy et al., 2007.

3.2.1.2. Exploration de la mémoire non spatiale

Operant Chamber (OC)

Principe :

Le dispositif se compose d'une chambre comportant un système de distribution de nourriture ou d'eau sucrée pouvant être actionné par deux leviers (**figure 24**). L'animal placé dans ce dispositif est entrainé à actionner ces leviers suivant un ordre précis afin d'obtenir une récompense alimentaire. Le nombre d'erreurs commises permet alors d'évaluer l'apprentissage au fil de plusieurs sessions (Dillon et al., 2008)(Cleary et al., 2005).

Exemple d'article concernant des modèles Alzheimer : (Richardson et al., 2002).

3.2.2. Les tests à renforcement négatif

3.2.2.1. Exploration de la mémoire spatiale

Morris Water Maze (MWM)

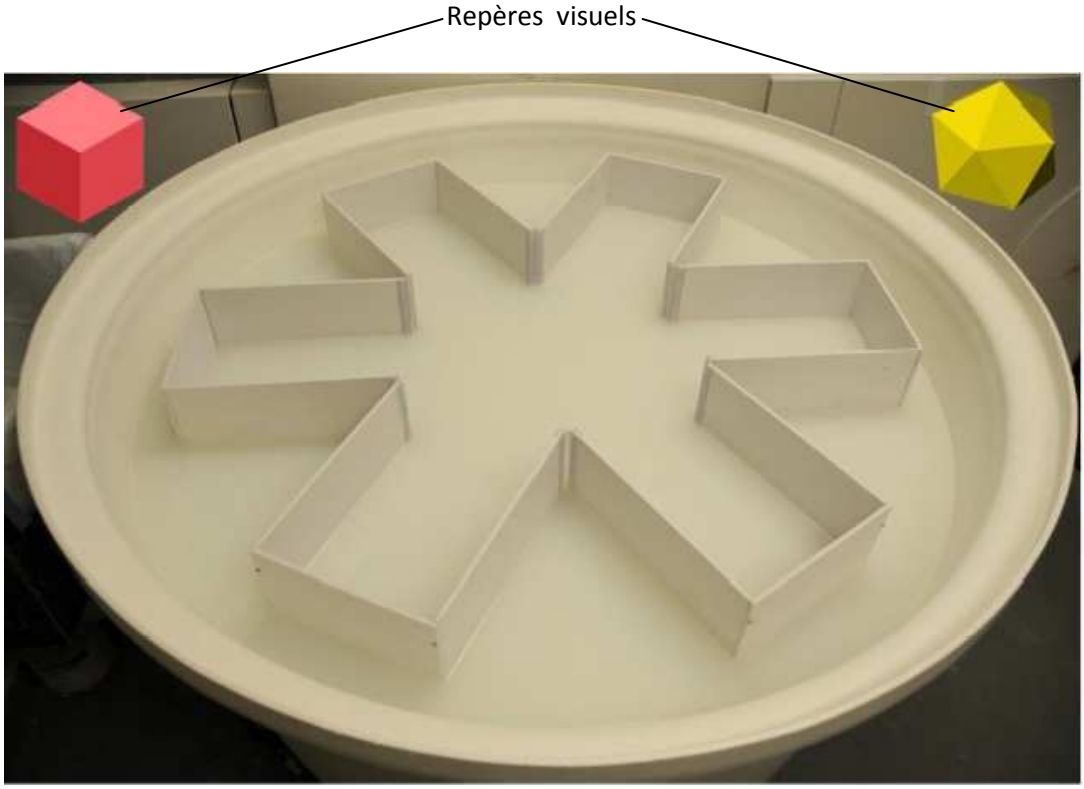
C'est le test le plus couramment utilisé pour des études d'évaluation de la mémoire dépendant de l'hippocampe. Il a été développé pour la première fois par Richard Morris en 1984 (Morris, 1984).

Principe :

Le test utilise une piscine circulaire (120 cm de diamètre pour les souris et 190 cm pour les rats) divisée en quatre cadrans virtuels et remplie d'eau rendue opaque afin de rendre invisible une plateforme immergée sous 1 cm d'eau (**figure 25**). Dans ce test, l'eau sert de renforcement négatif car elle représente un milieu aversif pour l'animal, ce qui constitue l'élément de motivation permettant de déclencher la recherche et la mémorisation de la position de la plateforme (échappatoire). Pour cela, l'animal est placé dans un des quatre cadrans et est laissé libre de nager pendant une certaine durée (souvent 60 ou 90 secondes). Des repères visuels sont placés autour de la piscine pour permettre à l'animal de mémoriser la position de la plateforme. L'apprentissage est alors apprécié par la diminution du temps nécessaire pour trouver la plateforme au fil de plusieurs sessions. Cette durée est appelée : temps de latence. La distance totale parcourue peut également servir de paramètre d'évaluation de l'apprentissage.

Protocole pour l'étude de la mémoire de référence :

Il existe deux variantes dans ce test permettant d'évaluer soit la mémoire de référence, soit la mémoire de travail (Ben et al., 2010)(Morgan, 2009)(Terry, 2009). Le protocole de mémoire de référence est le plus couramment rencontré. Dans cette variante, la plateforme est placée dans l'un des quatre cadrans et sa position reste fixe tout au long des essais. A l'inverse, le cadran de départ est changé de manière aléatoire entre chaque passage. Après une session d'apprentissage, un test sans plateforme est réalisé dans lequel l'animal est laissé libre de nager dans la piscine pendant une durée fixe. Le temps passé dans le cadran où était placée la plateforme est alors comparé avec le temps passé dans les trois autres cadrans. Une durée plus longue passée dans le cadran plateforme permet de valider une rétention de l'information par l'animal. Il s'agit du test de rétention ou



<u>Figure 26</u> : Photographie d'un Radial Arm Water Maze à six bras.

Source : Puzzo et al., 2014.

<u>Figure 27</u> : Photographie d'un Barnes Maze.

Source : Amador-Arjona et al., 2011.

« probe test » en anglais. Il est souvent effectué 24 heures après le dernier passage avec plateforme mais cette durée peut être variable suivant les protocoles (par exemple 10 heures : Coltman et al., 2011).

Protocole pour l'étude de la mémoire de travail :

La deuxième variante rencontrée consiste, cette fois-ci, à faire varier la position de la plateforme de manière aléatoire entre chaque série de tests. Lors d'une session de tests, l'animal apprend tout d'abord à mémoriser la position de la plateforme lors d'un premier essai (informative trial). La mémoire de travail est alors évaluée lors des essais suivants, après des périodes de seulement une minute entre chaque passage (Yamada et al., 1999).

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Odero et al., 2010)(Lesné et al., 2006)(Platt et al., 2011) ; modèles non transgénique (Dayton et al., 2012b)(Chavant et al., 2010)(Borbély et al., 2014)(Yamada et al., 1999).

Radial Arm Water Maze (RAWM)

Principe :

Le RAWM (labyrinthe à bras radial immergé) est un test associant la piscine de Morris et le RAM (Morgan, 2009). Il s'agit d'installer, dans une piscine, des couloirs formant les bras d'un labyrinthe radial (**figure 26**). L'animal est placé dans l'un des bras et est laissé libre de nager dans le labyrinthe. Comme dans le MWM, l'animal doit trouver une plateforme immergée constituant l'échappatoire en s'aidant de repères visuels. Dans ce test, l'intérêt des bras est qu'ils permettent d'évaluer un nombre d'erreurs commises et également de différencier la mémoire de travail (bras revisités) de la mémoire de référence (nombre de bras sans plateforme visités). Les deux mêmes types de protocoles utilisés dans le MWM sont retrouvés dans le RAWM (Alamed et al., 2006) :

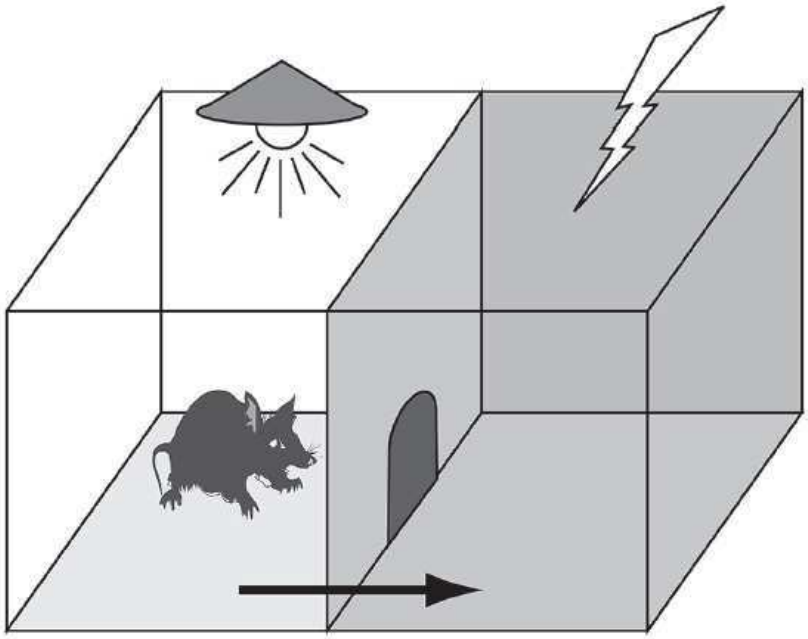
- Le protocole étudiant plus spécifiquement la mémoire de travail en faisant varier la position de la plateforme de manière aléatoire et en fixant le bras de départ.
- Le protocole d'évaluation de la mémoire de référence qui consiste à fixer la position de la plateforme et à faire varier le bras de départ de manière aléatoire.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Trinchese et al., 2004)(Kiyota et al., 2011)(Aytan et al., 2013) ; modèles non transgéniques (Srivareerat et al., 2011).

Barnes Maze (BM)

Principe :

Ce test développé par Carol Barnes en 1979 (Barnes, 1979) est composé d'une planche circulaire percée de plusieurs trous (généralement 20) situés à sa périphérie (**figure 27**). La planche est placée en hauteur et est éclairée par une source lumineuse relativement intense. Cet environnement constitue un milieu aversif pour un rongeur qui est un animal nocturne et est habitué à évoluer dans



<u>Figure 28</u> : Représentation schématique du test de Passive Avoidance.

Source : Brodziak et al., 2014.

des endroits confinés. Un des trous permet d'atteindre une petite chambre non éclairée qui constitue ici l'échappatoire à trouver par l'animal. Il est alors possible d'évaluer un déficit de mémoire en comptant le nombre de visites et de visites multiples des différents trous effectuées par un animal au cours de plusieurs essais. Pour évaluer plus spécifiquement la mémoire de travail, la position de l'échappatoire peut être changée de manière aléatoire entre chaque passage.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Cohen et al., 2013) (Kallop et al., 2014) ; modèles non transgéniques (Post et al., 2011).

Il existe des variantes à ce test en utilisant un renforcement positif. Il suffit alors de placer des récompenses alimentaires dans certains trous de la même manière que dans un RAM (Post et al., 2011).

3.2.2.2. Exploration de la mémoire non spatiale

Passive or Active Avoidance (PasA ou ActA)

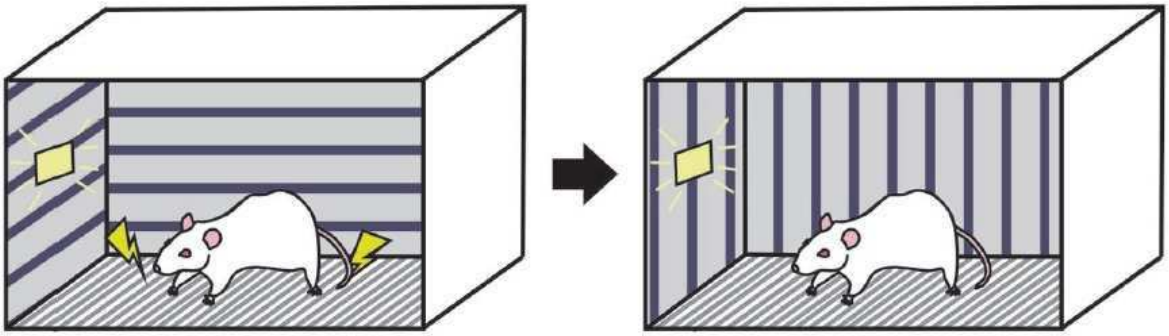
Principe :

Dans ce type de tests, l'animal est entrainé à produire une action adaptée afin d'éviter des chocs électriques.

Dans les tests d'évitement actif, l'animal doit par exemple changer de pièce lors de l'apparition d'un signal (lumineux ou sonore). Le nombre d'erreurs (non changement de pièce) permet alors d'évaluer un déficit de mémoire lors d'un passage réalisé sans choc électrique et après une certaine durée suivant le dernier entrainement. Cette durée dépend du type de mémoire qui est exploré (mémoire à court terme ou rétention dans le temps d'un apprentissage).

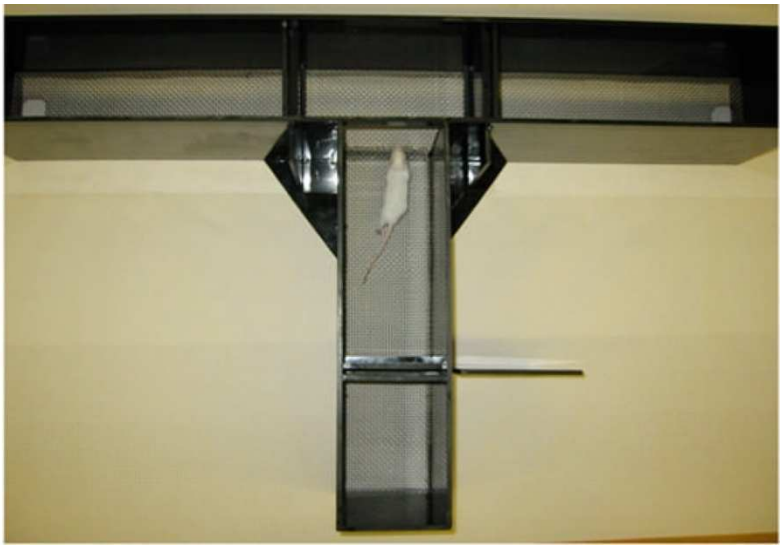
Pour l'évitement passif, l'animal est entrainé à ne pas produire une action qui serait naturelle pour un rongeur. Par exemple, dans un dispositif comprenant deux pièces accessibles, l'une étant dans l'obscurité et l'autre éclairée, l'animal est entrainé à ne pas passer dans la pièce obscure qui est la seule à être électrifiée (**figure 28**). Une autre possibilité est de placer une plateforme de petite taille dans une pièce électrifiée permettant d'échapper aux chocs électriques. L'animal est placé sur cette plateforme et, par répétition de passages, est entrainé à ne pas en descendre (Ben et al., 2010). Lors d'un test réalisé sans chocs électriques et après une certaine durée suivant le dernier passage d'entrainement, un déficit de mémoire est évalué en observant le temps que met l'animal à changer de pièce ou a descendre de la plateforme.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Cho et al., 2011) ; modèles non transgéniques (Wang and Wang, 2002)(Doyle et al., 1990)(Maurice et al., 1996).



<u>Figure 29</u> : Représentation schématique du test de Fear Conditionning.

Source : Patten et al., 2014.



<u>Figure 30</u> : Photographie d'un T Maze.

Source : Moy et al., 2007.

Fear Conditionning (FC)

Principe :

C'est un test de conditionnement par la peur qui consiste à faire associer à un animal, un environnement ou un signal avec un événement désagréable (**figure 29**). L'animal est placé dans une boite où le sol est électrifié. L'animal est alors conditionné à éprouver un stress lorsqu'il est placé dans cette boite. Un phénomène de « freezing » (tremblements) est alors observé. La présence et la durée du « freezing » sert de paramètre permettant d'évaluer le niveau de mémorisation jusqu'à plusieurs jours après le conditionnement. Ce type de mémoire dépend plus des émotions et n'est donc pas spécifique de l'hippocampe mais plutôt de l'amygdale. Si les chocs électriques sont précédés d'un signal lumineux ou sonore, le conditionnement dépend seulement de l'amygdale. Si les chocs électriques sont associés seulement à l'environnement (sans signal précédent les chocs), le conditionnement dépend de l'axe amygdale-hippocampe.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Kallop et al., 2014) (Zhang et al., 2005) ; modèles non transgéniques (Granic et al., 2010).

3.2.3. Les tests sans renforcement

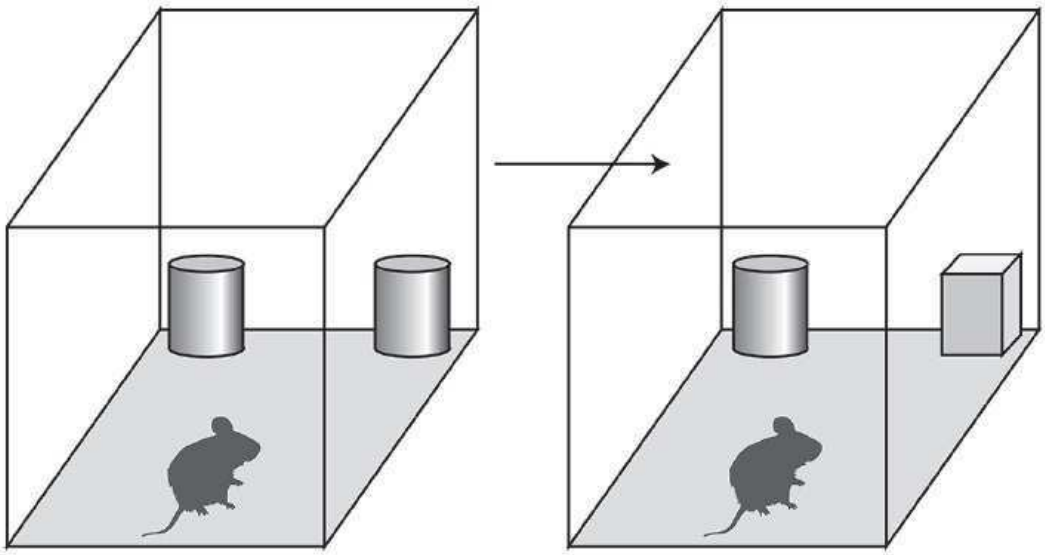
3.2.3.1. Exploration de la mémoire spatiale

Y ou T Maze (YM ou TM)

Principe :

Les tests d'alternance spontanée sont réalisés dans des labyrinthes composés de trois bras en forme de T (**figure 30**) ou de Y. Ces tests partent du principe théorique qu'un rongeur ne visite pas deux fois le même bras successivement. L'animal est placé dans l'un des trois bras du labyrinthe et est laissé libre d'explorer le dispositif pendant une durée d'en général cinq minutes. Lors d'un unique passage dans ce labyrinthe, le pourcentage d'alternance dans les trois bras est calculé par rapport au nombre de visites totales. Une alternance correspond à une visite successive des trois bras sans repasser par l'un des bras. Une baisse du taux d'alternance en comparaison d'un groupe témoin est associée à un trouble de la mémoire de travail (Sarter et al., 1988)(Maurice et al., 1996).

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Pietropaolo et al., 2012) ; modèles non transgéniques (Ramirez et al., 2011)(Meunier et al., 2013)(Chavant et al., 2010)(Sipos et al., 2007).



<u>Figure 31</u> : Représentation schématique du test de Novel Object Reconition.

Source : Brodziak et al., 2014.

3.2.3.2. Exploration de la mémoire non spatiale

Novel Object Reconition (NOR)

Principe :

Ce test est basé sur le principe qu'un rongeur explore préférentiellement un objet nouveau. L'animal est placé une première fois dans une arène avec deux objets pendant une durée de plusieurs minutes. Puis, lors du test, l'un des deux objets initialement présent est remplacé par un objet différent. L'animal est replacé dans l'arène et le pourcentage de temps qu'il passe à proximité du nouvel objet est calculé par rapport au temps passé à proximité de l'autre objet (**figure 31**). Un déficit de mémoire correspond à une exploration équivalente entre les deux objets. Le type de mémoire exploré (long terme ou court terme) dépend de l'intervalle de temps entre les deux passages.

Exemples d'articles concernant des modèles Alzheimer : modèles transgéniques (Cohen et al., 2013) (Platt et al., 2011)(Sankaranarayanan et al., 2015) ; modèles non transgénique (Meunier et al., 2013) (Sipos et al., 2007).

Il existe également une variante à ce protocole où l'un des objets est simplement changé de place au lieu d'être remplacé (Binder et al., 2012)(Platt et al., 2011).

3.3. Avantages et inconvénients des principaux tests

Les tests de navigation et d'orientation spatiale sont décrits comme étant les tests les plus dépendants et les plus spécifiques d'une lésion de l'hippocampe (Sutherland and McDonald, 1990)(Becker et al., 1980). Le MWM semble l'un des mieux appropriés d'autant plus qu'il présente l'avantage d'être le plus couramment utilisé donc comportant le plus d'éléments de comparaison dans la littérature. Cependant, les tests des labyrinthes à bras radiaux, permettent de dissocier la mémoire de travail de la mémoire de référence au sein d'un même protocole (Smith et al., 1998)(Morgan et al., 2009) par le comptage du nombre de visites et semblent un peu plus sensibles car plus complexes que le MWM.

Les tests sans renforcement, c'est-à-dire le YM et le NOR, sont rapportés comme étant moins sensibles d'un déficit de mémoire chez des modèles animaux de la MA. En effet, certains modèles de souris ou de rats transgéniques, connus pour présenter des troubles cognitifs dans des tests de navigation spatiale, ont montré des déficits plus tardifs voir aucun déficit dans ces tests (Pietropaolo et al., 2012)(Cohen et al., 2013).

Certains tests posent des problèmes d'ordre éthique. C'est par exemple le cas des tests utilisant des chocs électriques ou encore les tests basés sur les récompenses alimentaires qui nécessitent « d'affamer » les animaux pendant les périodes d'expérimentation afin de s'assurer de leur « motivation » à effectuer une tâche.

Il existe cependant plusieurs biais pouvant influencer l'interprétation des résultats et pouvant les rendre inexploitables. Ces biais sont à prendre en compte pour le choix d'un test.

Tests		Avantages		Inconvénients	Biais potentiels via effets				
		Mémoire Spatiale	Différenciation mémoires travail/référence		anxiolytiques	anti-nociceptif	perte d'appétence	locomoteur	olfactif
Renforcement +	RAM	X	X	Restriction nourriture Entrainement			X		X
	OC			Restriction nourriture Entrainement long			X		
Renforcement -	MWM	X			X			X	
	RAWM	X	X		X				
	BM	X	X		X				X
	PasA / ActA			Chocs électriques	X	X		X	X
	FC			Chocs électriques dépendant amygdale	X	X			
Sans Renforcement	YM / TM	X							X
	NOR			Entrainement					X

<u>Tableau 6</u> : Récapitulatif des avantages et inconvénients des différents tests de mémoire.

RAM : Radial Arm Maze ; OC : Operant Chamber ; MWM : Morris Water Maze ; RAWM : Radial Arm Water Maze ; BM : Barnes Maze ; PasA / ActA : Passive Avoidance / Active Avoidance ; FC : Fear Conditionning ; YM / TM : Y / T Maze ; NOR : Novel Object Recognition.

Il s'agit, par exemple, de biais liés à la nature des rongeurs comme celui de l'odorat : le chemin emprunté par un rongeur au sein d'un labyrinthe peut être influencé par la « trace olfactive » laissée par l'animal qui l'a précédé ou encore par l'utilisation de produits ménagers divers utilisés pour le nettoyage. Les tests réalisés en piscine permettent de s'affranchir en partie de ce biais. L'effet d'un traitement peut également influencer l'interprétation d'un test. Voici une liste non exhaustive de différents biais pouvant être rencontrés :

- Effet sur l'activité locomotrice dans des tests où le critère d'apprentissage dépend d'une durée à effectuer une tâche. C'est le cas par exemple du MWM ou des tests d'évitement actif.
- Effet sur l'appétence dans des tests à renforcement positif basés sur l'obtention de récompense alimentaire. C'est le cas du RAM et des OC.
- Effet anxiogénique ou anxiolytique dans l'ensemble des tests à renforcement négatif.
- Effet anti nociceptif dans les tests à chocs électriques. C'est le cas du FC et des tests d'évitement.

Un autre paramètre peut influencer le choix d'un test. Certains tests nécessitent obligatoirement des étapes d'habituation au dispositif et d'entrainement à une tâche avant de pouvoir passer au test de mémoire proprement dit. Les tests concernés sont ceux basés sur l'obtention d'une récompense alimentaire où il faut habituer les animaux à chercher de la nourriture dans un nouvel environnement (Xu et al., 2009). Ces périodes peuvent être relativement longues, c'est le cas en particulier des OC où il faut entrainer les animaux à associer l'action d'appuyer sur un levier pour obtenir de la nourriture. Dans ce cas, la phase d'entrainement peut être supérieure à un mois (Cleary et al., 2005).

Les avantages et les inconvénients des différents tests sont repris dans le **tableau 6**.

<u>Choix du test dans nos travaux</u> :

Dans les expérimentations réalisées dans cette thèse, notre choix s'est tout d'abord porté sur le MWM du fait de son utilisation par de nombreuses équipes et de sa spécificité des lésions de l'hippocampe. Puis, notre choix s'est tourné sur l'utilisation d'un RAWM car il présente la possibilité de différencier la mémoire de travail de la mémoire de référence au sein d'un même protocole. Or la mémoire de travail semble plus spécifique de lésions de type Alzheimer au sein de l'hippocampe (Aggleton et al., 1989)(Baddeley, 1992)(Becker et al., 1980). De plus, le RAWM présente les avantages du MWM mais également les avantages du RAM car il constitue une combinaison de ces deux tests.

4. Electroencéphalographie et maladie d'Alzheimer

4.1. Généralité sur les électroencéphalogrammes

L'électroencéphalogramme (EEG) a été inventé en 1929 par le médecin allemand Hans BERGER. C'est un tracé représentant l'activité électrique d'une large population de neurones, en particulier ceux situés au niveau du cortex cérébral. En effet, l'EEG est obtenu en plaçant plusieurs électrodes sur le cuir chevelu d'un patient afin de capter l'activité électrique générée par ces neurones. Le signal obtenu est alors amplifié puis retranscrit sous forme d'un tracé. L'EEG permet ainsi d'étudier l'activité électrique du cerveau suivant différentes régions (selon la position des électrodes) et lors de différents états (actif, différents stades du sommeil, tâche cognitive…).

Le signal d'EEG peut être décomposé en différents types d'ondes (ou rythmes) en fonction de leur fréquence grâce à une transformation de Fourrier. Chez l'Homme, le signal se décompose en six différentes ondes : l'onde delta (δ) : 0,3 à 4Hz, thêta (θ) : 4 à 8Hz, alpha (α) : 8 à 12Hz, bêta (β) : supérieur à 13Hz et gamma (γ) : supérieur à 30Hz (Colrain et al., 2009). Plus la fréquence d'une onde est élevée, plus son amplitude diminue. Ceci est dû à l'état de synchronisation des différentes populations de neurones : plus celles-ci transmettent un signal de manière synchronisé entres-elles, plus le signal d'EEG enregistré sera lent et de forte amplitude. L'état de synchronisation dépend directement de l'activité cognitive : plus il y a de populations de neurones non synchronisées entre-elles, plus l'activité est intense.

Grâce à l'enregistrement de l'activité électrique du cerveau via l'EEG, le sommeil a été divisé en plusieurs stades en fonction du type d'onde observé. La détection de ces stades a été standardisée par Rechtschassen et Kales en 1968 (source : Hori et al., 2001). Cinq stades ont été définis : les stades 1 à 4 allant de l'endormissement au sommeil lent très profond qui sont caractérisés par le ralentissement progressif de la fréquence de l'EEG du stade 1 à 4 avec plus de 50% de rythmes δ au stade 4, et le sommeil paradoxal ou REM pour Rapid Eye Movement. Ce dernier est caractérisé par un tracé d'EEG présentant une augmentation des rythmes θ et ressemblant au tracé observé pendant les périodes d'activités (d'où le terme de sommeil paradoxal). Pourtant, le tonus musculaire est pratiquement nul et des mouvements oculaires rapides et saccadés peuvent être observés pendant ce stade (d'où le terme de REM). Par opposition au REM, le terme de sommeil NREM (Non-Rapid Eye Movement) est souvent employé dans la littérature. Il désigne généralement le sommeil lent avec une dominance des rythmes δ.

Les études des EEG ont également permis de mettre en évidence des modifications de l'activité électrique du cerveau déclenchée par un stimulus externe (signal sonore ou lumineux) ou interne (tâche cognitive). Il s'agit du potentiel évoqué ou event-related potentials (ERPs) en anglais. Ce potentiel peut être modifié (durée et délai d'apparition) en cas de troubles cognitifs comme dans la MA (Prichep, 2007)(Shin, 2010).

4.2. Revue bibliographique des perturbations mesurables par EEG dans la MA

Un des symptômes de la MA concerne les troubles du sommeil (Deuschle et al., 2014). Il a été observé que le cycle nycthéméral des patients atteints de la MA présente de grosses perturbations avec une hypersomnie le jour et des phases d'insomnies pendant la nuit (McCurry et al., 1999)(Dauvilliers, 2007). Une des hypothèses mise en avant est que ce dérèglement proviendrait d'une dégénérescence de l'hypothalamus ainsi que du réseau cholinergique du système limbique, ces deux structures étant impliquées dans le contrôle des rythmes circadiens (Yesavage et al., 2003)(Schmidt et al., 2013). Ces perturbations concernent la plupart du temps des stades tardifs de la maladie (McCurry et al., 2000). Elles touchent de 25% à plus de 40% des patients atteints par la MA en fonction de son degré de sévérité (McCurry et al., 2000)(Moran et al., 2005)(Dauvilliers, 2007).

Les analyses d'EEG permettent d'affiner les caractéristiques de ce symptôme. Il a ainsi été mis en évidence que le sommeil, en plus d'être fragmenté, présente des anormalités dans son architecture. Par exemple, les patients atteints de MA présentent une diminution de la durée du REM et un allongement de la durée nécessaire à son apparition en comparaison avec des sujets « sains » du même âge (Leiser et al., 2011)(Schmidt et al., 2013)(Deuschle et al., 2014)(Christos, 1993). D'après certains auteurs, ces modifications du REM et tout particulièrement l'allongement de son temps d'apparition, seraient corrélées avec la sévérité des troubles cognitifs (Zhang et al., 2005) (Deuschle et al., 2014).

Un autre point d'étude concerne l'analyse de la fréquence des différents rythmes ainsi que de leurs puissances enregistrées à la surface du cerveau lors des différents états du patient (sommeil, actifs, après un stimulus…). Il a été constaté d'une manière générale, en fonction de la sévérité de la maladie, que la puissance de l'onde θ est d'abord augmentée, puis les puissances des ondes α et β sont diminuées et enfin que la puissance de l'onde δ est augmentée (Prichep, 2007)(Shin, 2010)(Luckhaus et al., 2008)(van der Hiele et al., 2007)(van der Hiele et al., 2011)(Leiser et al., 2010). De plus, la diminution des ondes β et α ainsi que l'augmentation de l'onde θ sont corrélées avec une diminution des scores obtenus lors de tests de mémoire (rétention verbale ou visuelle) lorsqu'elles sont enregistrées pendant ces tests (Roh et al., 2011). Plusieurs équipes focalisent leur recherche plus particulièrement sur les modifications des rythmes θ car elle semble être la première touchée avec l'évolution de la maladie. En effet, des études ont mis en évidence que l'augmentation de la puissance des rythmes θ est retrouvée chez des patients atteint de MCI, donc avant un diagnostic de MA, à un stade où ils ne présentent encore aucune modification du volume de l'hippocampe en IRM. Ce changement d'onde a été mis en évidence pendant les phases de sommeil (REM et NREM) alors qu'elles ne présentaient encore aucune modification de leur architecture (Hot et al., 2011). Les auteurs émettent alors l'hypothèse que les troubles cognitifs observés chez ces patients ont un lien direct avec la perturbation de l'onde θ car ces rythmes seraient impliqués dans la formation de la mémoire au sein de l'hippocampe. D'autres auteurs ont constaté ce type de modification en étudiant des changements de fréquences des rythmes pendant le REM. Un ralentissement global de la fréquence des rythmes du signal enregistré pendant le REM a été mis en évidence dans la MA (Prinz et al., 1992). Les auteurs parlent d'un « shift » des rythmes de haute fréquence (β et α) vers des rythmes de plus basse fréquence (θ) d'où la hausse de la puissance des rythmes θ et la baisse des rythmes β et α. Ce « shift » est d'abord constaté de manière précoce pendant le REM avant d'être observé durant des phases d'activitées du patient au cours de l'évolution de la MA (Moraes et al., 2006).

Ce phénomène serait le reflet de l'atteinte des fibres cholinergiques du système limbique qui intervient lors de stade précoce de la MA (Petit et al., 1993)(Hassainia et al., 1997)(Moraes et al., 2006).

Enfin, les analyses d'EEG ont permis de caractériser d'autres changements de l'activité électrique du cerveau : une augmentation des décharges épileptiques retrouvée régulièrement chez les patients atteints de la MA (Amatniek et al., 2006), et des modifications de l'ERP après un stimulus. Ces modifications d'ERP (en particulier un allongement du temps d'apparition) semblent particulièrement intéressantes car elles sont observées chez des patients atteints de MCI, plusieurs années avant que le diagnostic de MA soit posé. De plus, ces changements ne sont pas retrouvés sans la conversion de MCI à démence de type MA et constitueraient donc un élément prédictif de l'évolution de cette maladie (Prichep, 2007)(Shin, 2010)(Chapman et al., 2011).

Conclusion : La majorité des auteurs cités considèrent que les changements de l'activité électrique du cerveau analysés par EEG peuvent constituer un nouveau bio-marqueur de la MA. Il permettrait soit de confirmer un diagnostic en combinaison avec les autres tests déjà réalisés (bio-marqueurs du LCR, tests cognitifs, IRM…), soit de prédire l'évolution du stade MCI. Globalement, les changements les plus étudiés sont ceux concernant le REM ainsi que les rythmes θ car ils seraient les reflets de lésions des fibres cholinergiques du système limbique caractéristiques de cette maladie.

4.3. Revue bibliographique d'analyses d'EEG dans des modèles animaux de la MA

En recherche préclinique, les articles concernant l'étude d'EEG chez des modèles animaux de la MA sont peu nombreux. Dans ces études, les électrodes étaient placées au contact du cortex cérébral (contre la dure-mère) ou insérées directement dans la zone du cerveau ciblée (via des micro-électrodes). Ces analyses ont permis de mettre en évidence certains points communs entre la maladie humaine et différents modèles de la MA.

La dérégulation du cycle nycthéméral a été observée chez un modèle de souris triple transgéniques (PLB1) exprimant à la fois les dépôts amyloïde et les DNFs. Dans cette étude, les souris (animal nocturne) ont présenté une augmentation de leur activité pendant le jour et une augmentation de leur phase d'inactivité pendant la nuit. Cette dérégulation de leur cycle intervient avant l'apparition des dépôts amyloïdes et serait donc un marqueur précoce d'atteinte du SNC (Sterniczuk et al., 2010).

En ce qui concerne l'architecture du sommeil, et en particulier le REM, plusieurs résultats sont retrouvés :

- Pas de changement du REM mais fragmentation du sommeil avec une diminution du temps de NREM et une augmentation du temps d'éveil dans un modèle de souris transgénique triple transgénique PLB1 (Platt et al., 2011).
- Fragmentation du sommeil avec baisse du REM et du NREM observée avec l'apparition des dépôts amyloïdes (à partir de neuf mois) dans un modèle de souris transgénique APP/PS1. L'architecture peut être préservée en immunisant les souris contre le peptide Aβ1-42. Cette immunisation entraine également la disparition des plaques observées à neuf mois. Les auteurs concluent alors au rôle joué par les plaques amyloïdes sur les troubles du sommeil (Roh et al., 2012).

- Baisse de la durée du REM et du NREM de manière précoce (à partir de cinq mois), avant l'apparition des plaques amyloïdes dans un modèle de souris transgénique APP/PS1 (Jyoti et al., 2010).
- Baisse de la durée du REM avant même la fragmentation du sommeil et l'apparition des plaques dans un modèle de souris transgénique APP. Cette baisse de REM précoce apparaît dans ce cas à six mois avec une détérioration des fibres cholinergiques (Zhang et al., 2005).

En ce qui concerne l'analyse des différentes ondes cérébrales dans des modèles Alzheimer, les résultats présentés dans différents articles sont parfois contradictoires, mais les modifications de l'onde θ semblent prépondérantes :

- Ralentissement de la fréquence des rythmes θ intra-hippocampal après un stimulus (pincement de la queue) dans un modèle de rat anesthésié et traité par injection de peptide Aβ1-42 oligomérique au niveau de la *cisterna magna* (Peña-Ortega and Bernal-Pedraza, 2012).
- Baisse de la puissance des rythmes θ enregistrés à la surface de l'hippocampe après injection intra-hippocampal d'un mélange de peptide Aβ1-42 / Aβ1-40 (ratio 2/1) chez le rat. Cette baisse devient significative à partir de 21 jours après injection. Les rats présentent également à ce stade un déficit de mémoire dans un test de NOR (Villette et al., 2010).
- Dans un modèle de souris transgénique APP : forte baisse de la puissance des rythmes θ et baisse de la puissance des rythmes γ au niveau de l'hippocampe observée à huit mois (Rubio et al., 2012).
- Dans des modèles de souris transgéniques APP/PS1 : baisse de la puissance des rythmes θ à partir de quatre mois. La baisse s'accentue avec l'âge des souris et est corrélée avec l'augmentation du nombre de dépôts amyloïdes retrouvés dans l'hippocampe et perte de la formation de LTP enregistrée *in vivo* (Scott et al., 2012). Cette baisse des rythmes θ s'accompagne d'une hausse des rythmes α et β (Wang et al., 2002). Cependant certaines équipes observent un effet inverse avec une augmentation de la puissance des rythmes θ au niveau de l'hippocampe pendant les phases d'activité et avant l'apparition des dépôts amyloïdes (Jyoti et al., 2010).

Il existe également des études faites sur l'analyse des décharges épileptiques dans des modèles de souris transgéniques APP/PS1. Ces analyses montrent, comme chez des patients atteints de la MA, une augmentation de ces décharges (Palop et al., 2007).

<u>Conclusion</u> : Il existe peu d'études s'intéressant aux EEG en préclinique et il n'y a aucune analyse d'EEG réalisée sur un modèle de MA présentant une tauopathie. L'évaluation de l'EEG présente pourtant plusieurs avantages : les résultats obtenus semblent relativement proches de ce qui est trouvé chez l'Homme (trouble du cycle circadien, modification du REM et de l'onde θ) et les changements de l'activité électrique semblent être en lien direct avec les lésions amyloïdes ce qui permettrait de réaliser un suivi longitudinal de l'évolution de ces lésions *in vivo.* Cependant, plusieurs résultats sont contradictoires. Les différences observées entre certaines équipes peuvent s'expliquer par les différentes méthodes utilisées : anesthésie ou non, position des électrodes, stades dans lesquels est évaluée la puissance des différentes ondes…

4.4. Lien entre mémoire et REM

Il est admis que la consolidation de la mémoire se fait pendant le sommeil et que des troubles cognitifs peuvent être liés à des perturbations du sommeil (Rauchs et al., 2010)(Diekelmann and Born, 2010). Par exemple, il a été démontré que des sujets ayant été privés de sommeil à la suite d'un apprentissage dans un labyrinthe virtuel, présentent une moins bonne rétention de l'information par rapport à des sujets sans privation de sommeil (Rauchs et al., 2008). Il est également admis que la consolidation de la mémoire se fait en particulier pendant les phases de rêves qui correspondent aux phases de REM (Rodríguez-Vázquez et al., 2012).

Ces hypothèses ont pu être vérifiées chez le rongeur grâce à des techniques de privation de sommeil. Les animaux sont manipulés régulièrement pour les priver de sommeil pendant une courte période (Binder et al., 2012). Mais ils peuvent plus spécifiquement être privés de REM en les plaçant sur une plateforme de petite taille entourée d'eau. Dans ces conditions expérimentales, le relâchement du tonus musculaire nécessaire à l'apparition du REM ne peut pas se faire (Smith, 1996). Il a ainsi pu être démontré qu'une privation totale de sommeil entraine des déficits de consolidation de la mémoire (Binder et al., 2012), mais également qu'une privation seulement du REM peut entrainer des déficits de mémoire dans un test de fear conditionning (FC) après un entrainement (McDermott et al., 2003). D'une manière plus spécifique, la privation de REM a montré des déficits seulement de la mémoire de référence dans un test de RAM, lorsque cette privation est réalisée juste après un apprentissage (Smith et al., 1998).

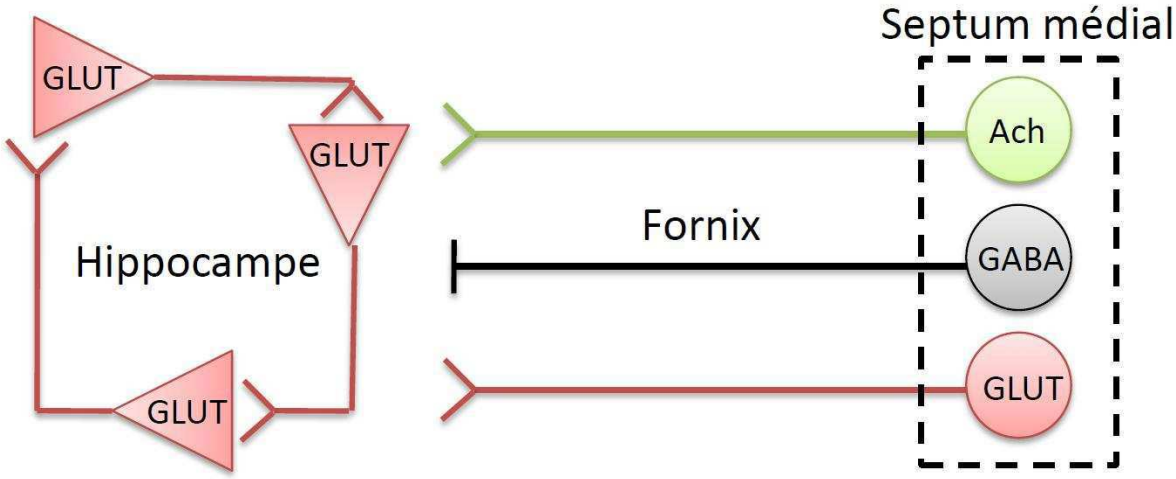
Le lien entre REM et LTP (mécanisme de plasticité synaptique à l'origine de la formation de la mémoire) a également été mis en évidence. Plusieurs études ont montré qu'une privation de REM entraine une baisse de la formation des LTP, ce qui contribuerait donc à une diminution de la capacité à la formation d'une mémoire à long terme (Campbell et al., 2002)(Davis et al., 2003).

<u>Conclusion</u> :

Dans la MA, une baisse du REM est observée. Or, cette phase de sommeil est directement impliquée dans la formation de la mémoire. Certains auteurs suggèrent donc que les déficits de mémoire observés dans la MA pourraient-être aggravés par les troubles du sommeil (Rauchs et al., 2010).

4.5. Lien entre hippocampe, REM et rythmes thêta

La formation des LTP au sein du réseau de l'hippocampe est connue pour son rôle dans le stockage à long terme (voir chapitre 3). Or, il semble que les phases de REM soient également impliquées dans cette fonction avec la formation des LTP (voir chapitre précédent). La question se pose alors sur l'existence d'une interaction entre l'hippocampe et le REM ainsi que le rôle de cette interaction dans la mémoire et dans la MA. Le lien entre hippocampe et REM peut résider dans les rythmes θ induis par les fibres cholinergiques du système limbique :



<u>Figure 32</u> : Représentation schématique de la boucle trisynaptique de l'hippocampe et de son innervation provenant du septum médial.

L'hippocampe est innervé par des fibres cholinergiques (en vert), gabaergiques (en noir) et glutamatergiques (en rouge).

Source : schéma adapté de Vega-Flores et al., 2014.

Hippocampe et rythmes θ :

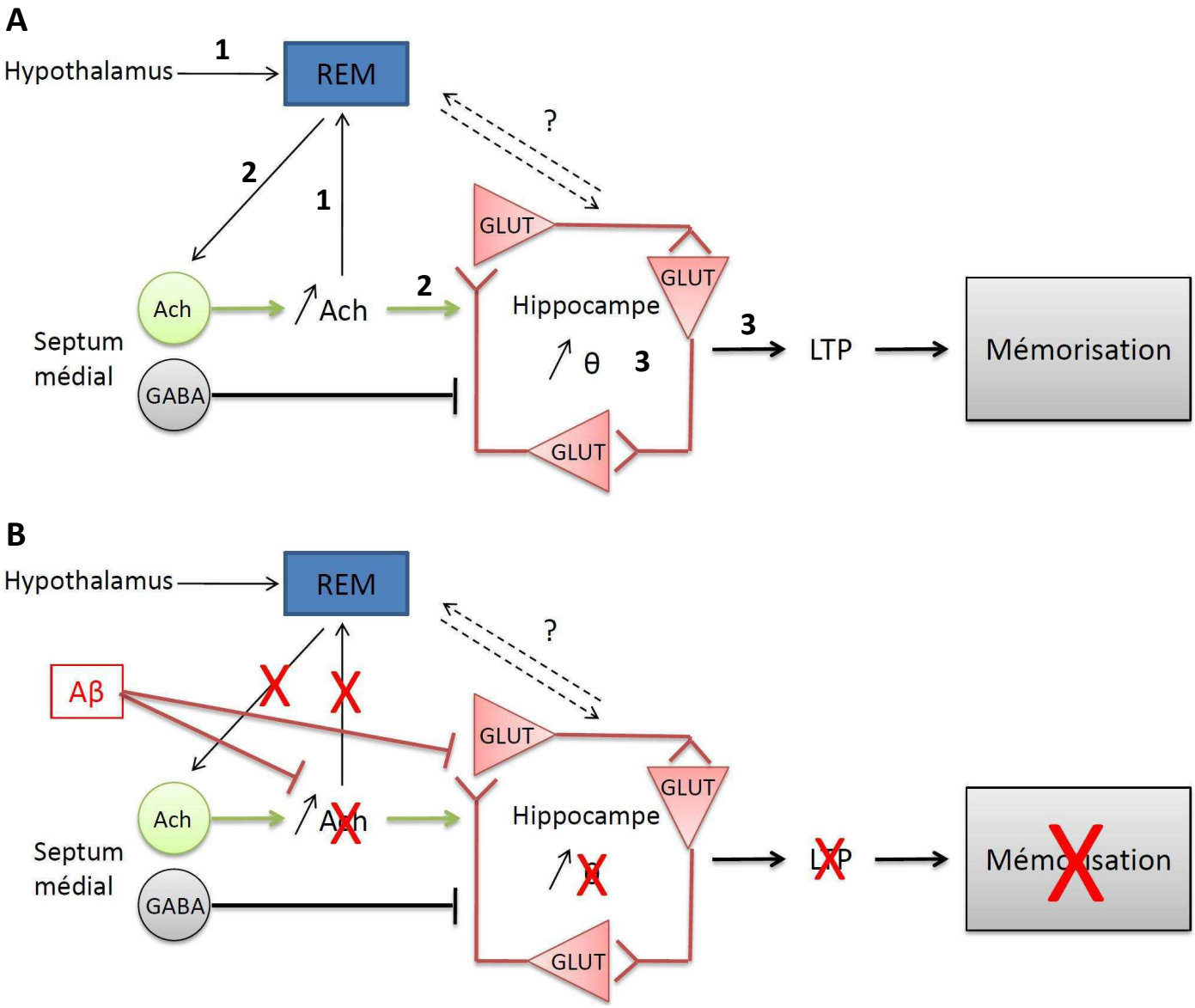
Il a été démontré que le fonctionnement normal de l'hippocampe dépend des rythmes θ. En effet, une augmentation de la puissance des rythmes θ est enregistrée directement au niveau de l'hippocampe chez le rat pendant une exploration ou pendant la réalisation de tests cognitifs (Buzsáki and Draguhn, 2004)(Manns et al., 2007). De plus, les neurones pyramidaux de l'hippocampe, en particulier ceux de la région CA1, ont la propriété intrinsèque de générer ces rythmes θ (Buzsáki, 2002)(Rubio et al., 2012)(Tsutajima et al., 2013). L'hippocampe est innervé par le septum médial à travers le fornix via des fibres cholinergiques (atteintes dans la MA : Selkoe, 2002), gabaergiques et glutamatergiques (Vega-Flores et al., 2014 ; **figure 32**). Ces fibres modulent la formation des rythmes θ produits par l'hippocampe. Par exemple, une stimulation des fibres cholinergiques chez le rat anesthésié produit une augmentation de la puissance des rythmes θ enregistrés directement au sein de l'hippocampe (Hajós et al., 2013). L'utilisation d'antagonistes cholinergiques (scopolamine, atropine) ou d'antagonistes des récepteurs NMDA et AMPA sur ce modèle produit une inhibition des rythmes θ de l'hippocampe (Hajós et al., 2013). A l'inverse, l'utilisation d'un agoniste cholinergique (α7 nicotinique) produit une augmentation des rythmes θ (Siok et al., 2006). En ce qui concerne les fibres gabaergiques, leur activation par des agents anesthésiants ou par des benzodiazépines produit une inhibition des rythmes θ de l'hippocampe (Perouansky et al., 2010)(Siok et al., 2009). Une lésion du septum médial chez le rat entraine une inhibition totale des rythmes θ enregistrés dans l'hippocampe ainsi que de gros déficits de mémoire (Winson, 1978). Certains auteurs parlent donc du septum médial comme d'un « pacemaker » induisant et modulant les rythmes θ de l'hippocampe et par conséquent agissant sur son fonctionnement (Buzsáki, 2002).

REM et rythmes θ :

Une augmentation de la puissance de rythmes θ est également associée aux phases de REM (Winson, 1978)(Buzsáki, 2002) et plus particulièrement les rythmes θ provenant de l'hippocampe quand ils sont enregistrés chez le rat via des électrodes *in situ* (Rodenbeck et al., 2006). De plus, les phases de REM, tout comme le fonctionnement de l'hippocampe, sont modulées par des fibres cholinergiques. Il est observé une augmentation de la concentration en acétylcholine dans le cerveau pendant les phases de REM (Jasper and Tessier, 1971). L'utilisation d'agonistes cholinergiques réduit le temps d'apparition de REM alors que les antagonistes cholinergiques augmentent ce temps chez l'Homme (Sitaram et al., 1978). L'injection d'un inhibiteur de l'acétylcholinestérase pendant le sommeil chez des patients permet de déclencher une phase de REM (Sitaram et al., 1976). Chez des patients atteints de MA, il a été montré que le traitement par le donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, permet de rétablir la durée des phases de REM et de limiter le « shift » des rythmes de hautes fréquences vers des plus basses fréquences pendant le REM (Moraes et al., 2006).

Rythmes θ et mémoire :

Les rythmes θ sont considérés comme un activateur de la formation de la plasticité synaptique (LTP) au sein de l'hippocampe (Buzsáki, 2002)(Vertes, 2005). Lors d'expériences de formation de LTP sur coupe d'hippocampe, la stimulation la plus efficace est celle qui consiste à répéter des trains de stimulation suivant une fréquence correspondant au rythme θ (voir chapitre 3.1.3.3). Il semble alors logique d'envisager qu'une augmentation de la puissance des rythmes θ au sein de l'hippocampe est un mécanisme nécessaire à la formation de la mémoire. En effet, les agonistes gabaergiques entrainant une baisse des rythmes θ au sein de l'hippocampe, induisent en parallèle, des déficits de



<u>Figure 33</u> : Schéma hypothétique du rôle du REM et des fibres cholinergiques dans la plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe.

A : En condition normal :

1. Le REM est induit par l'hypothalamus ainsi qu'une augmentation du niveau en acétylcholine au niveau du système limbique.
2. L'activité des fibres cholinergiques du système limbique pendant les phases de REM module l'activité de l'hippocampe.
3. Les neurones glutamatergiques de la boucle trisynaptique de l'hippocampe, générent des rythmes θ qui sont à l'origine de la plasticité synaptique et donc de la formation de la mémoire.

B : En présence d'une surcharge amyloïde, le petide Aβ inhibe l'activation de l'hippocampe et la formation du REM via une action directe sur les fibres cholinergique et les synapses glutamatergiques.

mémoire dans un test de FC chez le rat (Perouansky et al., 2010). Il a également été démontré qu'il existe une corrélation entre une baisse des rythmes θ et une augmentation des fautes de mémoire de travail chez le rat, lorsque celle-ci est enregistrée directement pendant un test de RAM (Masuoka and Kamei, 2009)(Masuoka and Kamei, 2007). Chez l'Homme, une augmentation de ces rythmes est observée pendant des tests de mémoire (liste de mots à retenir) quand ils sont effectués avec succès (Lega et al., 2012).

Dans des modèles précliniques de MA, une baisse des rythmes θ enregistrés au sein de l'hippocampe, et induite par injection intrahippocampique de peptide Aβ, est associée à une diminution des performances dans des tests de mémoire (Villette et al., 2010). De plus, chez des souris transgéniques APP/PS1, une diminution des rythmes θ observée avec l'apparition des dépôts amyloïdes est associée à une perte de la capacité à former des LTP enregistrée *in vivo* au sein de l'hippocampe (Scott et al., 2010).

Conclusion :

Les rythmes θ semblent donc impliqués dans les mécanismes de consolidation de la mémoire pendant les périodes d'activité mais également pendant les phases de REM. Ces rythmes sont activés et maintenus par les fibres cholinergiques provenant du septum médial et par les fibres glutamatergiques de l'hippocampe. Ces fibres sont atteintes dans la MA (Selkoe, 2002), lors des stades III et IV (stades limbiques) qui correspondent à l'apparition des signes cliniques (Braak and Braak, 1991). La baisse de REM observée chez les patients atteints de la MA serait donc le reflet d'une atteinte de ces fibres (**figure 33**). Mais il paraît surprenant qu'une augmentation des rythmes θ soit observée pendant les phases de sommeil chez l'Homme atteint de MA, contrairement à ce qui est globalement constaté dans des modèles animaux de la MA. Plusieurs auteurs émettent l'hypothèse qu'il s'agit d'un mécanisme de compensation par hyperexcitabilité du septum médial ou par d'autres structures corticales qui pourraient prendre le relais de cette fonction (Rodriguez et al., 2011)(Hot et al., 2011). Cette hypothèse est confortée par le fait que cette augmentation est plus marquée chez des patients MCI atteints de troubles de mémoire mineurs par rapport à des patients MCI présentant des troubles plus sévères (Hot 2011). Une autre explication peut provenir du phénomène de « shift » des rythmes de hautes fréquences vers des plus basses fréquences, observé particulièrement pendant les phases de REM qui tend à faire augmenter les rythmes dans les gammes de fréquences θ et δ au détriment des β et α (Prinz et al., 1992).

Dans notre modèle animal de MA, nous avons choisi de réaliser des études d'EEG afin d'obtenir un suivi longitudinal de l'architecture du sommeil et du niveau des différents rythmes car ces paramètres semblent refléter un niveau d'atteinte de l'hippocampe.

Partie 2 : Expérimentation

5. Objectifs

L'objectif de ces travaux était de développer un nouveau modèle expérimental et non transgénique de la maladie d'Alzheimer chez le rat, reproduisant à la fois les lésions histologiques de type amyloïde et neurofibrillaire ainsi que les troubles de mémoire associés. Ce modèle devait également répondre aux critères suivants afin de pouvoir évaluer un potentiel effet pro-cognitif ou neuroprotecteur d'une substance testée dans le cadre d'un développement préclinique:

- Présenter des changements sur un ou plusieurs paramètres facilement évaluables et reproductibles comme une altération de la mémoire.
- Présenter des altérations durables dans le temps et pas seulement des effets liés à une inflammation aigüe consécutive aux injections intracérébrales.
- Si possible, présenter une progression des lésions dans le temps.

Dans un premier temps, nous avons développé notre modèle de la maladie d'Alzheimer en nous appuyant seulement sur les deux principales caractéristiques, à savoir les lésions histologiques typiques de la maladie et l'altération de la mémoire. Une fois que nous avons obtenu les effets souhaités sur ces deux paramètres et donc validé notre modèle, nous avons ensuite pu caractériser plusieurs effets induits par les lésions, notamment en suivant des paramètres biochimiques et en étudiant l'activité électrique cérébrale des rats.

6. Etude préliminaire

6.1. Introduction

Pour le développement de notre modèle de la MA, nous avons donc choisi de combiner une injection intracérébrale de peptide Aβ42, associée à un vecteur viral codant pour la protéine Tau humaine présentant la mutation P301L. Le vecteur viral nous a été gracieusement fourni par le Professeur Ronald R. Klein (Department of Pharmacology, Toxicology and Neuroscience, University of Shreveport, Louisiane, USA). Il s'agit d'un AAV sérotype 9 utilisé par son équipe pour la mise au point d'un modèle de la maladie de Parkinson (Klein et al., 2010)(Klein et al., 2009) et plus récemment pour l'étude de la MA (Dayton et al., 2012b)(Mustroph et al., 2012). Ils ont également testé plusieurs sérotypes d'AAV différents (8, 9 et 10) pour induire l'expression d'un gène au niveau du cerveau (Klein et al., 2008). Les sérotypes 2 et 5 étant déjà décrits comme moins efficaces que le sérotype 8 pour ce type de transfection (Burger et al., 2005). Ils ont conclu que le sérotype 9 est le plus efficace pour la transfection intracérébrale. D'après Klein, l'injection d'un AAV9 contenant le gène de la protéine Tau P301L permet bien d'induire l'expression de la protéine Tau humaine sous forme hyperphosphorylée. Des inclusions de cette protéine, mimant les DNF caractéristiques d'une tauopathie telle que la MA, sont alors observées au sein du cytoplasme des neurones, à proximité des sites d'injections (Klein et al., 2004)(Ramirez et al., 2011).

Durée post-injection	Traitement	Dose	Effectif de rats
2 semaines	Véhicule	/	2
	Tau	$2,1x10^8$ vg	2
	Aβ + Tau	2 nmol + $2,1x10^8$ vg	3
12 semaines	**Véhicule**	**/**	**3**
	Aβ	2 nmol	2
	Tau	$2,1x10^6$ vg	2
	Tau	$2,1x10^8$ vg	1
	Aβ + Tau	2 nmol + $2,1x10^4$ vg	1
	Aβ + Tau dose faible	**2 nmol + $2,1x10^6$ vg**	**3**
	Aβ + Tau dose forte	**2 nmol + $2,1x10^8$ vg**	**3**

Tableau 7 : Plan expérimental de l'étude préliminaire

Dans notre étude, nous avons choisi de réaliser une injection concomitante de ce vecteur avec le peptide Aβ42 sous une forme pré-agrégée, afin d'associer à la tauopathie, les dépôts amyloïdes extracellulaires. Nous avons utilisé la forme de 42 AA car elle est décrite comme la plus amyloïdogénique et la plus synaptotoxique (voir chapitre 1.3.1.1).

Les injections intracérébrales ont été réalisées par technique stéréotaxique afin de cibler l'hippocampe et plus particulièrement la couche de neurones pyramidaux CA1 qui est la première atteinte dans la MA d'après Braak et Braak (Braak and Braak, 1991). Nous avons choisi de cibler l'hippocampe car, en plus d'être l'une des premières structures atteintes dans la MA, son altération correspondrait aux premiers symptômes d'altération de la mémoire (voir chapitre 1.3.2.5). Afin d'évaluer d'éventuels troubles de mémoire induits par les différents traitements, nous avons opté pour un test de navigation spatiale car ces tests sont considérés comme permettant d'évaluer le fonctionnement de l'hippocampe (voir chapitre 3.2). Nous avons alors retenu le Morris water maze (MWM) qui est le plus fréquemment rencontré dans la littérature.

Les premières phases expérimentales réalisées ont été conduites sur de petits lots d'animaux : deux à trois animaux par groupe de traitement. Elles avaient pour but de valider l'injection intrahippocampique de peptide Aβ42 déjà décrit dans la littérature (Ryu and McLarnon, 2008), de valider un choix de dose de vecteur AAV-tau P301L permettant d'induire des lésions de type neurofibrillaire sans provoquer une trop forte perte neuronale et de valider le test de mémoire choisi.

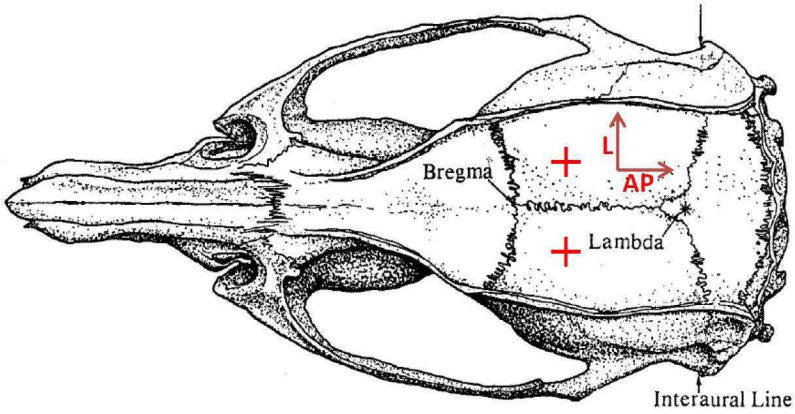
6.2. Matériels et méthodes

6.2.1. Plan expérimental

Les injections intracérébrales sont réalisées suivant quatre groupes de traitements :

- Injection du véhicule du peptide Aβ et du vecteur AAV pour la réalisation de groupe contrôle (H_2O_{UHQ} et Ringer lactate respectivement).
- Injection du peptide Aβ.
- Injection du vecteur AAV.
- Injection de l'association du peptide Aβ et de l'AAV.

Les différentes doses utilisées ainsi que les effectifs de rats inclus dans chaque groupe sont présentés dans le **tableau 7**. Les lignes grisées correspondent aux groupes testés dans le MWM (nommé groupe Véhicule, Abeta-Tau dose faible et Abeta-tau dose forte dans les figures) et la durée post-injection correspond au temps écoulé entre l'injection et le sacrifice des animaux réalisé pour l'analyse histologique des lésions.



Crâne de rat. Source : Paxinos & Watson

Coordonnées d'injections relatives au point bregma :

- **Antéro-Postérieur (AP) - 3,6**
- **Latéral (L) +/- 2**
- **Profondeur (P) - 2,8**

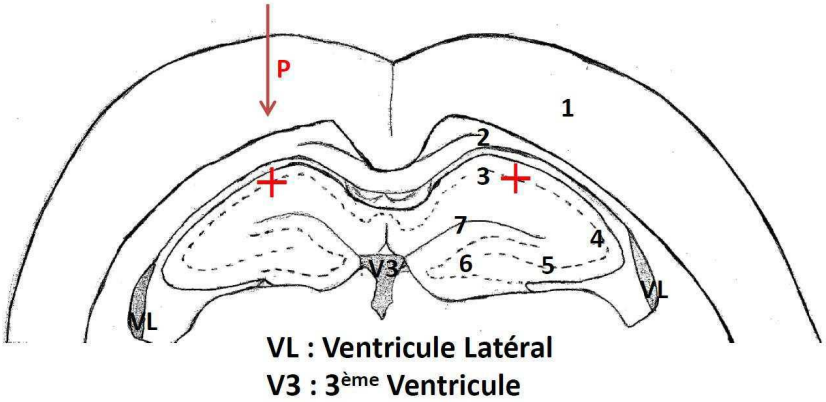


Schéma représentant la partie dorsale d'un cerveau de rat en coupe frontale, au niveau des sites d'injections.

+ : sites d'injections
1 : cortex parietal
2 : corps calleux
3 : CA1
4 : CA2
5 : CA3
6 : gyrus denté
7 : fissure de l'hippocampe

<u>Figure 34</u> : Représentation schématique du site d'injection intrahippocampique.

6.2.2. Animaux

Les rats utilisés sont des Sprague Dawley mâles, provenant de l'éleveur Janvier (Le Genest Saint-Isle, France), âgés d'environ huit à dix semaines (280 à 340 g) le jour des injections. Cette souche est identique à celle utilisée par l'équipe du Pr. Klein pour les injections intracérébrales d'AAV. Les injections sont réalisées sur des rats d'environ 300 g pour se rapprocher au mieux des coordonnées stéréotaxiques décrites dans l'atlas de Paxinos & Watson (The Rat Brain in stereotaxic coordinates, fourth edition).

Les animaux sont maintenus, par groupe de trois ou quatre individus, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, et dans une animalerie sous environnement contrôlé avec une température comprise entre 20 et 24°C, un taux d'humidité compris entre 45 et 65%, et des cycles jour/nuit de 12 heures (période de jour de 7h30 à 19h30).

Les expérimentations réalisées dans ces travaux ont été soumises à un comité d'éthique (comité d'éthique n° CEEA-111) et sont en accord avec la directive européenne relative à la protection des animaux vertébrés (Directive 2010/63/EU).

6.2.3. Injection stéréotaxique

Les injections intrahippocampiques sont réalisées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane, Axience, Pantin, France) à l'aide d'un cadre de stéréotaxie adapté aux rongeurs (Kopf Instruments, Düsseldorf, Allemagne). Le site d'injection correspond à la couche CA1 de l'hippocampe dont les coordonnées ont été déterminées à l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos & Watson (**figure 34**) et correspondent également à celles utilisées par Dayton (Dayton et al., 2012b) pour l'injection d'un AAV dans l'hippocampe dorsal. Deux injections sont réalisées par rats : une injection par hémisphère.

<u>Protocole chirurgical suivi</u> :

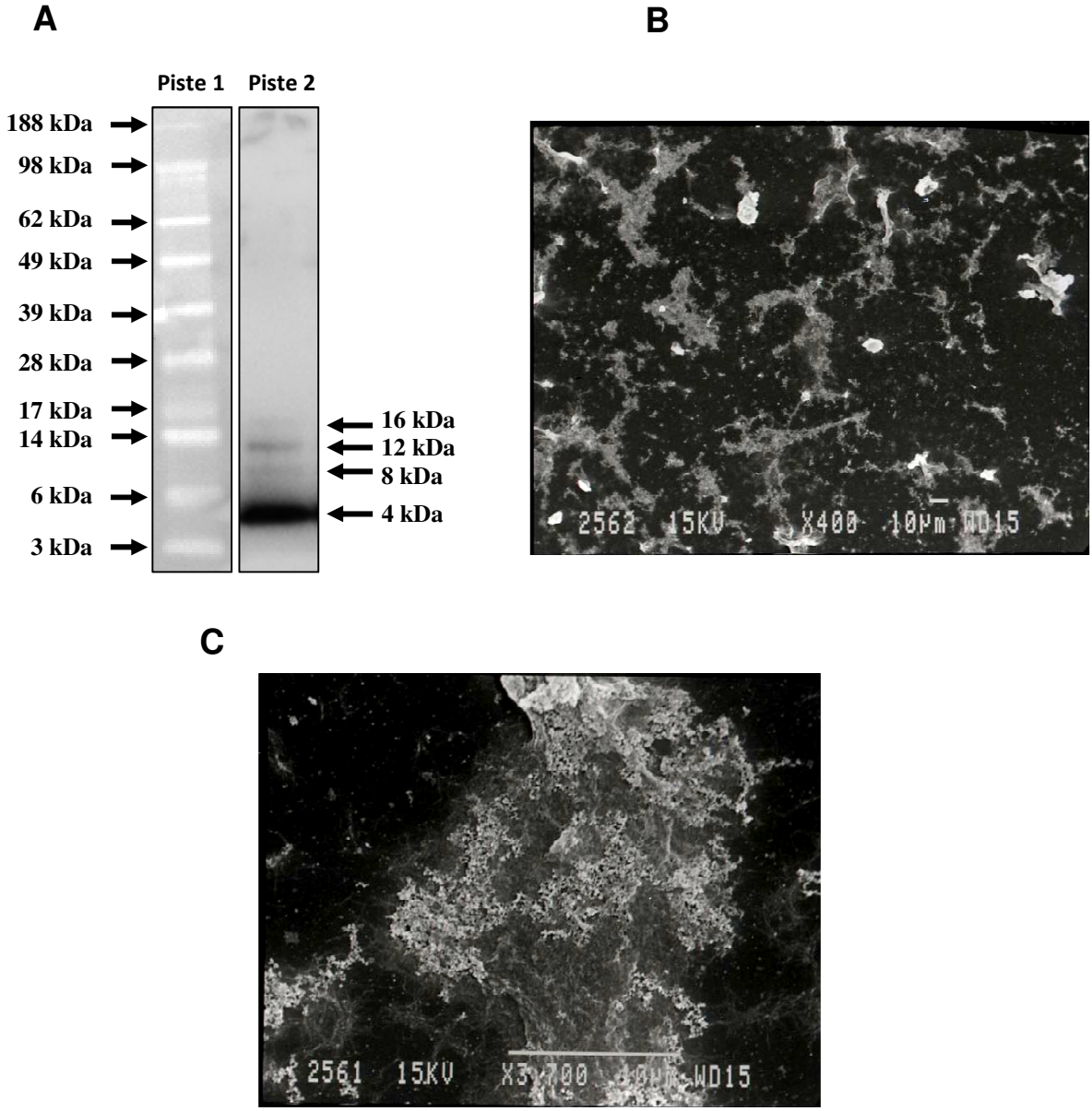
- L'ensemble du matériel chirurgical (scalpel, rugine, pinces) est préalablement autoclavé.
- L'animal est rasé au niveau du crâne.
- L'animal est maintenu en décubitus ventral sur une couverture chauffante avec contrôle de la température de façon à maintenir l'animal à 37°C.
- L'animal est placé en contention sur la planche de stéréotaxie à l'aide des barres d'oreilles de façon à ce qu'aucun mouvement du crâne ne soit possible.
- Une seringue Hamilton de 10 µL (série 701 RN, NH BIO, ditributeur Hamilton, Massy, France) reliée à une aiguille Hamilton de 26G (pointe type 3), est remplie avec la solution à injecter.
- La seringue est positionnée dans un nanoinjecteur (LEGATO 130, KD Scientific, Holliston, MA, USA) fixé au micromanipulateur du cadre de stéréotaxie.
- Le débit d'injection est réglé sur 0,8 µL/minutes avec un volume total de 4 µL injecté par site.
- La partie rasée est savonnée avec de la povidone iodée savon (VETOQUINOL, Lure, France) puis rincée à l'eau stérile. La povidone iodée solution 10% (VETOQUINOL, Lure, France) est ensuite appliquée sur la partie rasée à l'aide de compresses stériles.
- Une incision de 1 cm environ est réalisée le long du crâne, au niveau du point bregma.
- L'os du crâne est dégagé à l'aide d'une rugine et de deux pinces courbes de façon à localiser le point Bregma.

- De la povidone iodée solution 10% est appliquée sur la surface du crâne.
- La seringue Hamilton est déplacée à l'aide du micromanipulateur du cadre de stéréotaxie jusqu'à ce que l'aiguille fixée à la seringue se trouve parfaitement alignée avec le point Bregma. Les coordonnées antéropostérieures (AP) et latérales (L) du point bregma sont alors relevées.
- Les coordonnées (AP et L) des points à atteindre correspondant aux couches CA1 des hippocampes droit et gauche sont alors déterminées en prenant celles du point bregma comme origine :
    - **AP - 3,6 mm**
    - **L - 2 mm** pour le gauche et **+ 2 mm** pour le droit

- La seringue est déplacée en fonction des coordonnées calculées et l'aiguille Hamilton est délicatement descendue de manière à toucher la surface du crâne au niveau du site d'injection. La coordonnée P (Profondeur) de la surface du crâne est alors relevée.
- Le crâne est délicatement percé au niveau du site d'injection à l'aide d'une fraise de dentiste, de manière à ne pas léser la dure-mère. La dure-mère est ensuite incisée à l'aide d'une aiguille stérile.
- La seringue est ensuite abaissée à la coordonnée calculée en fonction de P (profondeur de la surface du crâne) : **P - 2,8 mm**.
- L'injection est ensuite réalisée puis la seringue est lentement remontée après une période d'attente de cinq minutes suivant l'injection.
- La même procédure est utilisée pour réaliser la deuxième injection.
- Une petite quantité de ciment dentaire (Aquacem ™, Dentsply, Weybridge, Angleterre) est préparée, puis déposée de manière à obstruer les trous réalisés au niveau du crâne.
- Après séchage du ciment dentaire (trois minutes environ), de la povidone iodée solution 10% est déposée à la surface du crâne puis épongée à l'aide de compresses stériles.
- Les plans cutanés sont ensuite refermés à l'aide de fils de suture résorbable, puis l'animal est retiré de la table de stéréotaxie.
- L'animal est déposé sur une couverture chauffante jusqu'à son réveil puis est placé dans une cage individuelle pendant une période d'au moins cinq jours.

Suivi postopératoire :

Les animaux sont observés quotidiennement pendant une période d'au moins trois jours afin de s'assurer de leur bonne récupération. De l'eau oxygénée et de la povidone iodée solution 10% sont appliquées quotidiennement sur leur cicatrice pendant la période de récupération. Si besoin, de la pommade Dermaflon® (Zoetis, Paris, France) est appliquée afin de faciliter la cicatrisation. Un suivi hebdomadaire de leur poids est également effectué.



<u>Figure 35</u> : Etat d'agrégation du peptide β-amyloïde 1-42 dilué dans l'eau distillée.

L'Aβ1-42 a été dilué dans l'eau distillée UHQ stérile à la concentration de 2,5 nmol/µL puis incubé pendant 48 heures à 37°C. Un Western-Blot (**A**) et une observation par microscopie électronique à balayage (**B** et **C**) ont été réalisés à partir de cette solution pour définir l'état d'agrégation de ce peptide avant l'injection dans le cerveau du rat. Pour le western blot, la membrane a été incubée dans une solution contenant un anticorps primaire monoclonal murin anti-Aβ1-42 humain (clone 4G8, 1/500), puis révélée après incubation dans l'anticorps secondaire anti-Ig de souris (1/1000) et application du révélateur Luminata Classico en utilisant l'imageur GBox (logiciel Gene Snap, Syngene). Une analyse de la masse moléculaire a été effectuée en utilisant le logiciel GeneTools (piste 1 : poids moléculaire Invitrogen 3-188kDa et piste 2 : Aβ1-42).

6.2.4. Substances injectées

- **Véhicule :** Solution composée de 20% d'H_2O_{UHQ} et de 80% de Ringer Lactate (Lavoisier, Paris, France).
- **Peptide Aβ :** Solution de peptide Aβ 1-42 (Merck Chemicals, Molsheim, France) reconstituée et pré-agrégée 48 heures à 37°C, dans de l'H_2O_{UHQ} à la concentration de 2,5 nmol par microlitre. Après ce délai d'incubation, la solution contient du peptide Aβ sous forme fibrillaire (**figure 35 B**), mais également sous forme monomèrique et agrégée en oligomères de petites tailles : deux, trois et quatre sous-unités (**figure 35 A**). Avant l'injection, une solution de Ringer Lactate est ajoutée à la solution de peptide Aβ de manière à obtenir un ratio de 80% de Ringer Lactate et 20% d'H_2O_{UHQ}, avec une concentration finale de peptide Aβ de 0,5 nmol par microlitre.
- **AAV-Tau :** Suspension de particules virales d'une concentration de 2,1 $.10^{10}$ particules par microlitre d'une solution de Ringer Lactate, fournie par le Professeur Ronald R. Klein (Department of Pharmacology, Toxicology and Neuroscience, University of Shreveport, Louisiane, USA). Le vecteur viral correspond à un AAV sérotype 9 contenant le gène de la protéine Tau humaine sous sa forme de 441 AA (forme 4R) et présentant la mutation P301L retrouvée dans des formes familiales de FTDP-17 (voir chapitre 2.2.6). La suspension de vecteur est diluée avec la solution de Ringer Lactate puis complétée avec de l'H_2O_{UHQ} de manière à obtenir un ratio de 80% de Ringer Lactate et 20% d'H_2O_{UHQ}, avec une concentration finale de 5,25 $.10^3$ particules par microlitre pour la dose injectée de 2,1 $.10^4$ particules, de 5,25 $.10^5$ particules par microlitre pour la dose injectée de 2,1 $.10^6$ particules et de 5,25 $.10^7$ particules par microlitre pour la dose injectée de 2,1 $.10^8$ particules.
  Carte du vecteur viral utilisé d'après Mustroph (Mustroph et al., 2012) :

  5'-TR2-CMV-MAPT-WPRE-pA-TR2-3'

  - **TR2** : AAV2 Terminal Repeats.
  - **CMV** : promoteur du Cytomegalo Virus.
  - **MAPT** : Microtubule Associated Protein Tau. Correspond au gène humain de la protéine Tau.
  - **WPRE** : Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element (enhancer).
  - **pA** : Polyadenylation signal.

- **Solution contenant le peptide Aβ et l'AAV-Tau :** Avant l'injection, la solution de peptide Aβ 1-42 reconstituée et pré-agrégée dans de l'H_2O_{UHQ}, est mélangée avec la suspension de particules AAV préalablement diluée dans le Ringer Lactate, de manière à obtenir un ratio de 80% de Ringer Lactacte et 20% d'H_2O_{UHQ}.

6.2.5. Test d'évaluation de la mémoire : Morris Water Maze

La mémoire spatiale de référence est évaluée selon la procédure du Morris Water Maze (voir chapitre 3.2), lors de la 11ème semaine post-injection. Le dispositif se compose d'une piscine circulaire de 120 cm de diamètre et de 56 cm de hauteur. Elle est remplie d'eau (40 cm de hauteur) rendue opaque par du blanc de Meudon. La température de l'eau est contrôlée régulièrement. Elle est comprise entre 18 et 22°C. L'échappatoire est constituée d'une plateforme de couleur blanche et immergée sous 1,5 cm d'eau de manière à la rendre invisible. Des repères visuels, permettant aux animaux de s'orienter, sont disposés autours de la piscine. Le passage des rats dans le MWM se fait suivant un ordre aléatoire établit par avance. La procédure de passage des animaux dans la piscine se divise en deux étapes :

- Phase d'apprentissage : deux sessions par jour et par rat espacés de 30 minutes, pendant quatre jours :

    - La plateforme est placée au milieu d'un des quadrants, 1 cm au-dessous du niveau de l'eau de manière à la rendre invisible. La position de la plateforme reste fixe pendant la durée de la phase d'apprentissage.
    - Au début de chaque session, le rat est placé de manière aléatoire dans un quadrant aléatoire face au mur. Le quadrant de départ est changé entre chaque rat et au début de chaque session de manière à ce que les quatre quadrants soient utilisés pour chaque rat après quatre sessions.
    - Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes maximum. Si au bout des 90 secondes, la plate-forme n'a pas été trouvée, l'animal est conduit jusqu'à elle.
    - Le rat doit rester 30 secondes minimum sur la plateforme à chaque session. S'il saute de la plateforme avant la fin des 30 secondes, l'animal est reconduit dessus et laissé le temps nécessaire pour atteindre les 30 secondes.
    - A la fin du test, le rat est séché puis déposé dans sa cage.

- Test de rétention : réalisé 24h après la dernière session d'apprentissage :

    - La plateforme est retirée de la piscine.
    - Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes maximum.
    - A la fin du test, le rat est séché puis déposé dans sa cage.

6.2.6. Immunohistochimie

Lors de la deuxième ou de la 12ème semaine post-injection (**tableau 7**), les rats sont sacrifiés afin de prélever leur cerveau et de réaliser un immunomarquage des lésions sur coupes paraffinées.

Prélévement et coupe des cerveaux : Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg, pentobarbital à 54,7 mg/mL, Ceva Santé Animale, Libourne, France), puis une perfusion corps entier de 150 mL de PBS froid (Phosphate Buffered Saline : 154 mM de NaCl, 1,543 mM de KH_2PO_4 et 2,7 mM de Na_2HPO_4 .$7H_2O$, ajusté au pH 7,2) puis de 150 mL de PFA (paraformaldéhyde, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) reconstitué à 4% dans le PBS,

Anticorps	Clone ou fluorochrome	Classe	Espèce hôte	Cible	Dilution	Fournisseur
Primaires	AD2	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 396 et 404 de Tau	1/500	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France
	AT100	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 212 et Thr 214 de Tau (anti-PHF)	1/20	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	4G8	Monoclonal	Souris	AA 17-24 du peptide humain Aβ	1/50	Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France
Secondaires	Alexa-488	Polyclonal	Ane	Ig de souris	1/50	Jackson Immuno Research, Villepinte, France
	RRX					

<u>Tableau 8</u> : Listes des différents anticorps utilisés dans l'étude préliminaire.

Ser : sérine ; Thr : thréonine

est réalisée par voie cardio-aortique. Ensuite, les cerveaux sont prélevés et fixés dans le PFA 4% durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les cerveaux sont rincés au PBS et conservés dans un bain de formol à 4% (VWR International, Fontenay-sous-bois, France) à température ambiante. Après une étape de déshydratation, puis d'imprégnation des tissus par la paraffine réalisée à l'aide d'un automate à inclusions à mouvements de fluides (Tissue TEK VIP 3000, Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France), les cerveaux sont inclus dans la paraffine, par tranches coronales d'environ 5 mm d'épaisseurs. Des coupes coronales de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome (SCIL/M2R-DIS, Altorf, France). Les coupes obtenues sont déposées sur des lames adhésives Superfrost® Plus (VWR International, Fontenay-sous-bois, France).

Procédure d'immunomarquage : Les coupes de cerveaux réalisées au microtome sont déparaffinées dans deux bains d'Histosol® (Shandon, Eragny, France) puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol dont le degré varie de façon décroissante (100%, 95% puis 75%). Après plusieurs lavages des coupes dans des bains d'H_2O_{UHQ} et de PBS, une étape de démasquage des sites antigéniques est réalisée en plaçant les coupes dans un bain de citrate de sodium (10 mM de citrate de sodium ajusté au pH 6) porté à ébullition pendant 10 minutes. Les coupes sont alors rincées au PBS puis 70 µL d'une solution de blocage et de perméabilisation composée de PBS, de Triton X-100 à 0,3% (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) et de BSA à 5% (Bovine Serum Albumin low IGG, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), sont déposés sur chaque coupe, pendant une heure à température ambiante. La solution de blocage et de perméabilisation est ensuite retirée, puis les coupes sont rincées avec du PBS. 70 µL de solution (composée de PBS, de Triton X-100 à 0,3% et de BSA à 1%) contenant les anticorps primaires dirigés contre les antigènes d'intérêts (**tableau 8**), sont alors déposés sur les coupes. La solution d'anticorps primaires est laissée à incuber une nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes sont rincées avec du PBS, puis 70 µL de solution (PBS/Triton X-100/BSA 1%) contenant les anticorps secondaires (dirigés contre les anticorps primaires et couplés à un fluorochrome : t**ableau 8**), sont déposés sur chaque coupes. Après une heure d'incubation et un rinçage des coupes au PBS, les noyaux cellulaires sont marqués avec 70 µL d'une solution (PBS/Triton X-100/BSA 1%) contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Sigma-Aldrich St-Quentin Fallavier, France) dilué au 1/5000, pendant 15 minutes à température ambiante. Pour finir, les coupes sont rincées dans des bains de PBS et d'H_2O_{UHQ}, puis les coupes sont montées entre lames et lamelles avec une colle pour milieux fluorescents (Fluoroschield®, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Une fois la colle séchée, les lames sont observées avec un microscope à fluorescence de type Olympus DP70 et la prise d'image est réalisée à l'aide d'une caméra digitale et d'un du logiciel Olympus DP-soft (Olympus S.A., Rungis, France).

6.2.7. Présentation et analyse des résultats

Suivi du poids : L'évolution pondérale de chaque animal est contrôlée une fois par semaine. L'analyse statistique a été effectuée seulement pour les groupes de trois animaux (Véhicule, Abeta-Tau dose faible, Abeta-Tau dose forte). Ce paramètre est présenté sous forme d'une moyenne pour chaque groupe ± SEM, en fonction du nombre de semaines post-injection. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule.

Evaluation des lésions histologiques : La présence ou non des lésions est évaluée par simple observation des coupes de cerveaux au microscope à fluorescence. Des prises d'images des observations caractéristiques ont été réalisées et sont présentées dans ce manuscrit. La barre d'échelle est présentée sous la forme d'un trait blanc au bas de chaque image.

Evaluation de la mémoire : Les passages, dans le MWM, de chaque rat sont enregistrés et analysés à l'aide d'un système de « tracking video » comprenant une caméra digitale placée au dessus du dispositif et du logiciel Ethovision® 3.1 (Noldus, Wageningen, Pays-Bas). Les paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage sont : la vitesse moyenne de nage et le temps que met chaque animal à trouver la plateforme (temps de latence). Les paramètres analysés lors du test de rétention sont : le temps total passé par chaque rat dans le quadrant correspondant à la position de la plateforme, et la fréquence de passage de chaque rat dans la zone virtuelle correspondant à la plateforme (retirée pendant ce test).

Les paramètres de vitesse de nage et de temps de latence sont présentés sous forme d'une moyenne pour chaque groupe ± SEM, en fonction du nombre de sessions (nombre de passage dans la phase d'apprentissage) réalisés. Ces moyennes sont obtenues, session par session, à partir de la somme des valeurs obtenues pour chaque rat lors de la session analysée, avec les valeurs obtenues lors des sessions précédentes (cumul des résultats de chaque rat, session par session). Ce cumul est réalisé afin de « normaliser » les résultats, c'est-à-dire de lisser un effet qui serait ponctuel (observé seulement lors d'un passage) et d'amplifier une légère différence qui se répéterait à chaque session. L'effet de chaque traitement sur ces deux paramètres est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).

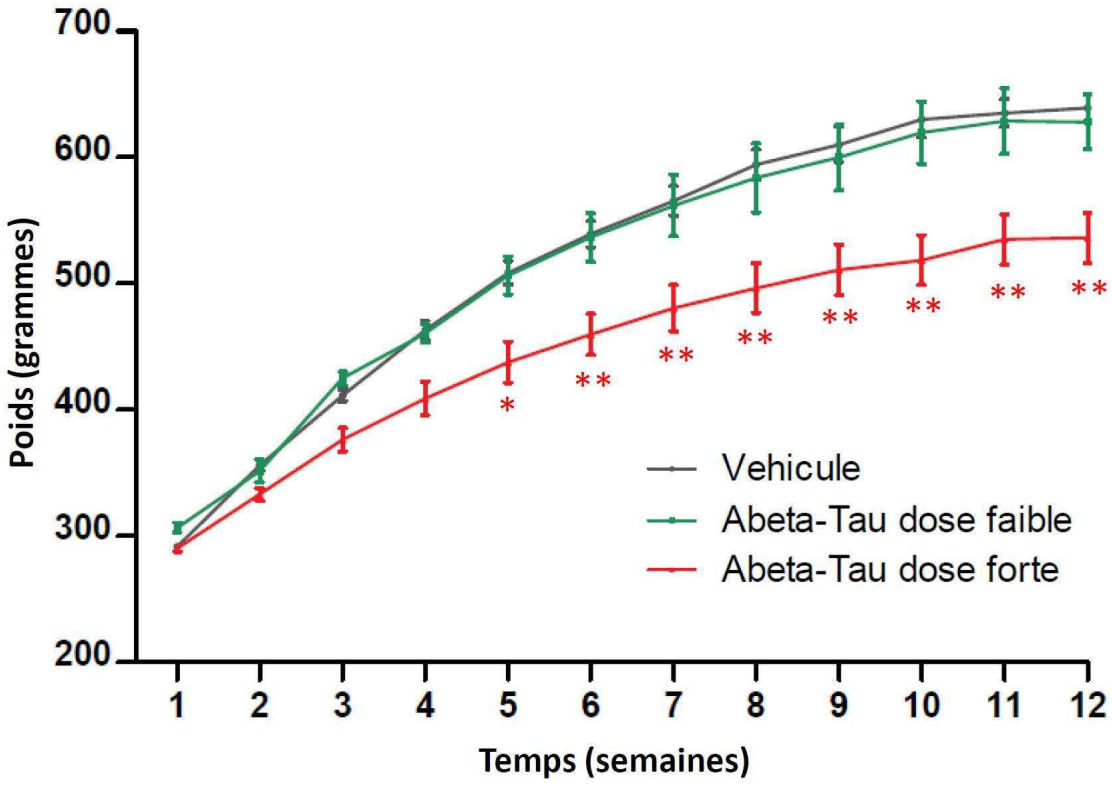
Les paramètres relatifs au test de rétention (temps total passé dans le quadrant plateforme et fréquence d'entrées dans la zone plateforme) sont présentés sous forme de médiane pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement sur ces deux paramètres est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Nous avons choisi d'analyser le test de rétention avec un test non paramétrique en raison de l'hétérogénéité rencontrée dans chaque groupe avec ces paramètres.

*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule.

6.3. Résultats

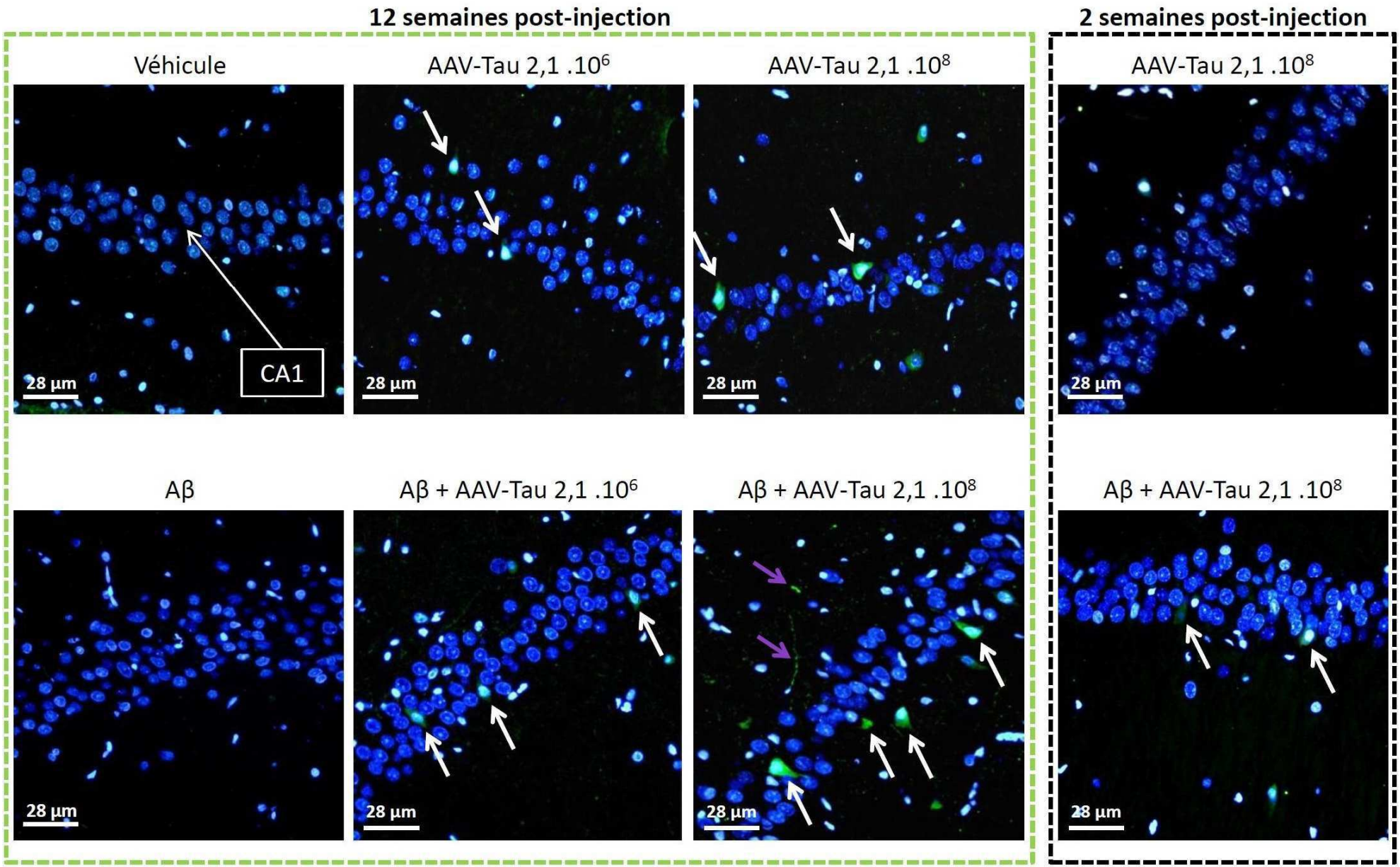
6.3.1. Suivi du poids

Un suivi hebdomadaire de l'évolution pondérale des rats des groupes : Véhicule, Abeta-Tau dose faible et Abeta-Tau dose forte, a été réalisé sur une période de 12 semaines post-injection (**figure 36**). La prise de poids des rats du groupe Abeta-Tau dose forte, s'est faite de manière moins rapide en comparaison avec les rats du groupe Véhicule. La différence de poids observée entre les rats du groupe Abeta-Tau dose forte et les rats du groupe Véhicule, devient significative après cinq semaines post-injection (P=0,015). Cette différence reste toutefois à relativiser, les effectifs étant seulement de trois individus pour chaque groupe. En revanche, le traitement Abeta-Tau dose faible n'induit pas d'effet sur la prise de poids des animaux en comparaison avec le groupe Véhicule.



<u>Figure 36</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux.

Abeta-Tau dose faible : AAV-Tau à 2,1 .10^6 particules.
Abeta-Tau dose forte : AAV-Tau à 2,1 .10^8 particules.
Peptide Aβ42 : 2 nmol pour les deux groupes Abeta-Tau.
Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. N=3 pour chaque groupe.



<u>Figure 37</u> : Marquage de la protéine Tau phoshorylée réalisé avec l'anticorps AD2.

Les images sont réalisées au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe. Les fléches blanches indiquent les inclusions de protéines Tau phosphorylées accumulées autour de noyaux cellulaires (en bleu). Les fléches violettes indiquent les lésions de type fibres tortueuses présentant la forme de filaments ou de points. Encadré vert : immunohistologie réalisé 12 semaines après les injections. Encadré noir : immunohistologie réalisé deux semaines après les injections.

6.3.2. Evaluation des lésions histologiques

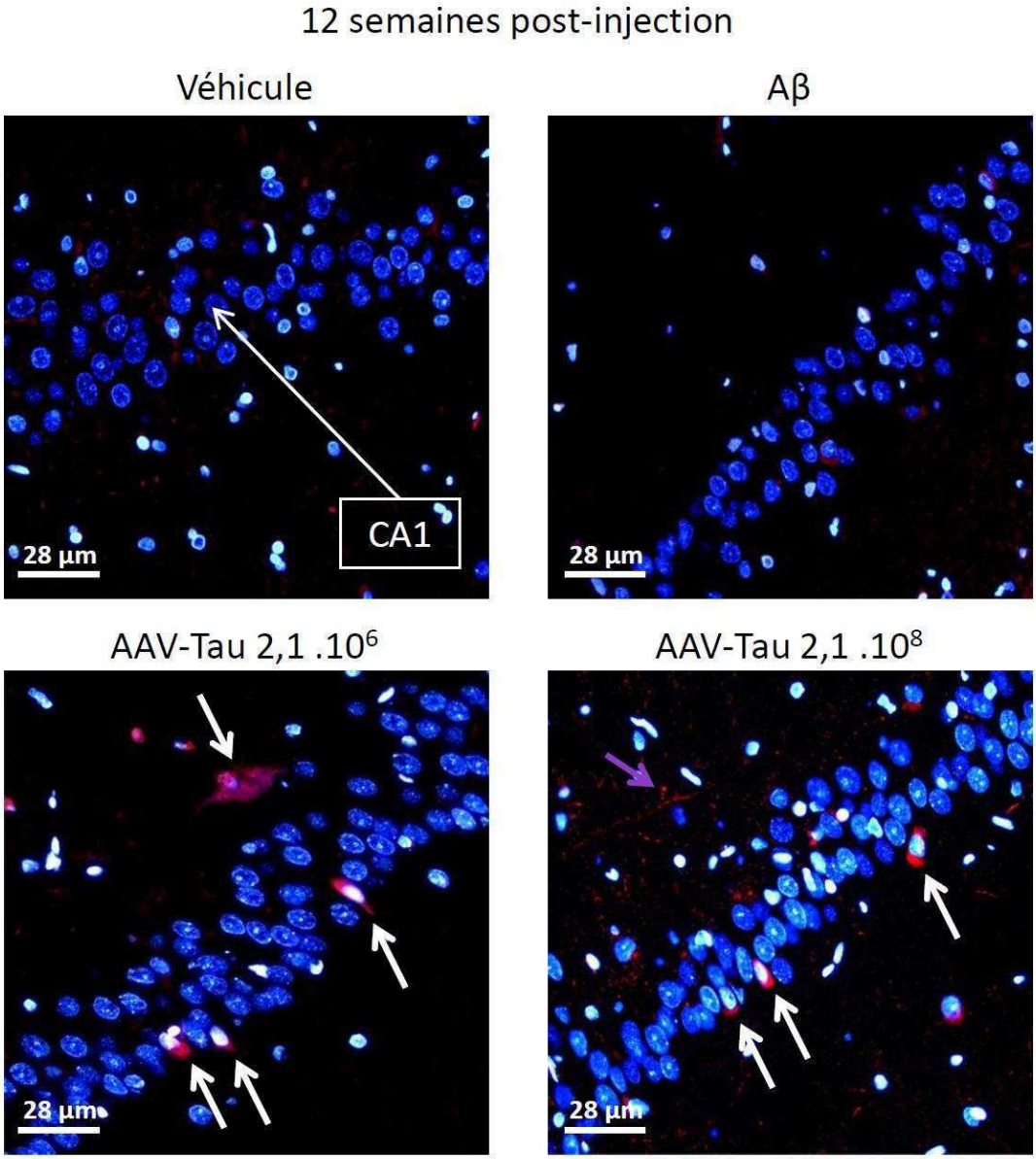
Lésions de type neurofibrillaire :

Un des objectifs de cette étude était de déterminer une dose de particules AAV-Tau qui, une fois injectée dans la couche CA1 de l'hippocampe de rats, permettrait de reproduire une pathologie neurofibrillaire, sans pour autant induire une trop forte perte de neurones. Pour cela, trois doses de particules AAV-Tau ont été testées avec une période d'incubation de 12 semaines (post-injection).

Aucun marquage de la protéine Tau n'a été constaté à la dose de 2,1 $.10^4$ particules de vecteur (résultats non montrés). A la dose de 2,1 $.10^6$ particules de vecteur, nous avons observé quelques rares marquages de la protéine Tau phopshorylée (anticorps AD2 dirigé contre la protéine Tau humaine phosphorylée au niveau de la sérine 396 et 404), accumulée autour de noyaux cellulaires (marqués au DAPI) présent dans la couche CA1 de l'hippocampe (**figure 37**). Les mêmes types de marquage sont observés à la dose de 2,1 $.10^8$ particules de vecteur, mais semblent plus nombreux et plus marqués qu'à la dose de 2,1 $.10^6$ particules. La présence de quelques fibres tortueuses contenant la protéine Tau humaine phosphorylée, sont également observées à proximité de la couche CA1, avec la dose de 2,1 $.10^8$ particules. Aucune différence n'a été observée sur ce type de marquage, avec une injection simple de vecteur AAV-Tau, en comparaison avec la co-injection du vecteur et du peptide Aβ42. De plus, aucun marquage de la protéine Tau phosphorylée n'a été observé chez les rat ayant reçus une injection simple de peptide Abeta.

La dose forte de particules (2,1 $.10^8$) a également été testée sur une courte période (deux semaines post-injection) afin de valider le caractère progressif de l'expression et de la phosphorylation de la protéine Tau humaine. Seulement quelques rares et faibles marquages de la protéine Tau phosphorylée, ont été observés chez un des rats du groupe Abeta-Tau dose forte (**figure 37, 2 semaines post-injection**).

Un autre anticorps dirigé contre la protéine Tau humaine phosphorylée a été testé. Il s'agit de l'anticorps AT100 reconnaissant spécifiquement des groupes phosphates situés sur la sérine 212 et la thréonine 214 de la protéine Tau. Les mêmes types de marquage qu'avec l'anticorps AD2 ont pu être observés chez les rats ayant reçus une injection de vecteur AAV-Tau à la dose de 2,1. 10^6 et 2,1. 10^8 particules (**figure 38**).



<u>Figure 38</u> : Marquage de la protéine Tau phosphorylée par l'anticorps AT100.

L'anticorps AT100 est dirigé contre la protéine Tau anormalement phosphorylée et retrouvée dans des extraits de PHF provenant de patients atteints de MA. Les fléches blanches indiquent les inclusions de protéines Tau phosphorylées, accumulées autour de noyaux cellulaires (en bleu, DAPI). La fléche violette indique les lésions de type fibre tortueuse.

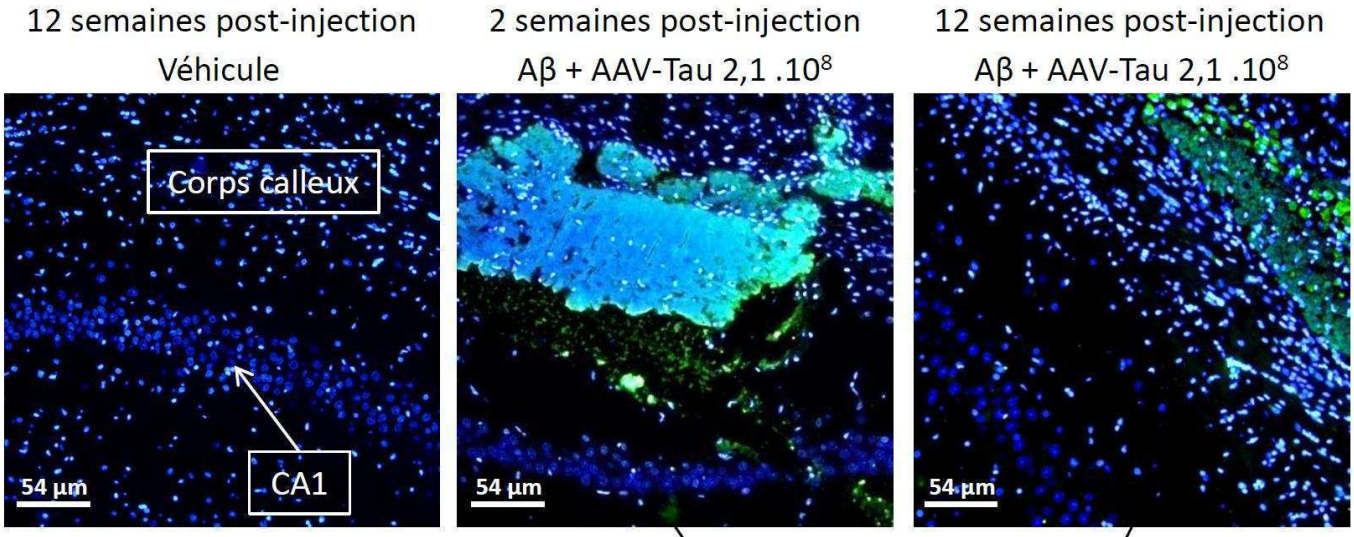
Lésions de type dépôt amyloïde :

Le marquage du peptide Aβ par l'anticorps 4G8, a permis de mettre en évidence la présence de dépôts de peptide Aβ, observés chez les rats ayant reçus une injection de peptide Aβ42, après deux ou 12 semaines post-injection (**figure 39**). Ces dépôts sont plus proches morphologiquement des dépôts diffus que des plaques séniles. En revanche, ils ont tous été observés entre la couche CA1 de l'hippocampe et le cortex pariétal, donc en dehors de la zone d'injection prévue. Les dépôts sont, soit retrouvés dans le corps calleux, soit situés entre le corps calleux et la couche CA1 de l'hippocampe, donnant ainsi l'aspect de « repousser » la couche CA1.

Ces types de dépôts ont été observés seulement chez les rats ayant reçus la co-injection de peptide Aβ42 et de vecteur AAV-Tau. Nous pensons qu'il s'agit seulement de hasard car les dépôts observés ne semblant pas s'étendre, il est nécessaire de réaliser le marquage sur des coupes de cerveau effectuées au niveau du site d'injection.

Aspect morphologique des couches neuronales de l'hippocampe :

Excepté le cas où la couche CA1 semble repoussée par le dépôt de peptide Aβ (**figure 39**), aucun changement morphologique de la structure des différentes couches de l'hippocampe n'a été observé avec le marquage DAPI (seule la couche CA1 est présentée dans les **figures 37, 38 et 39**).



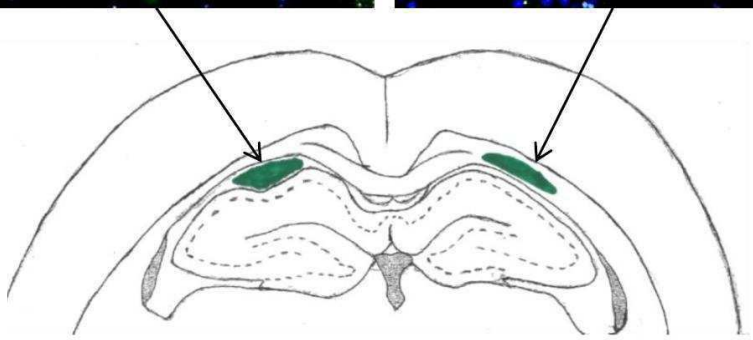
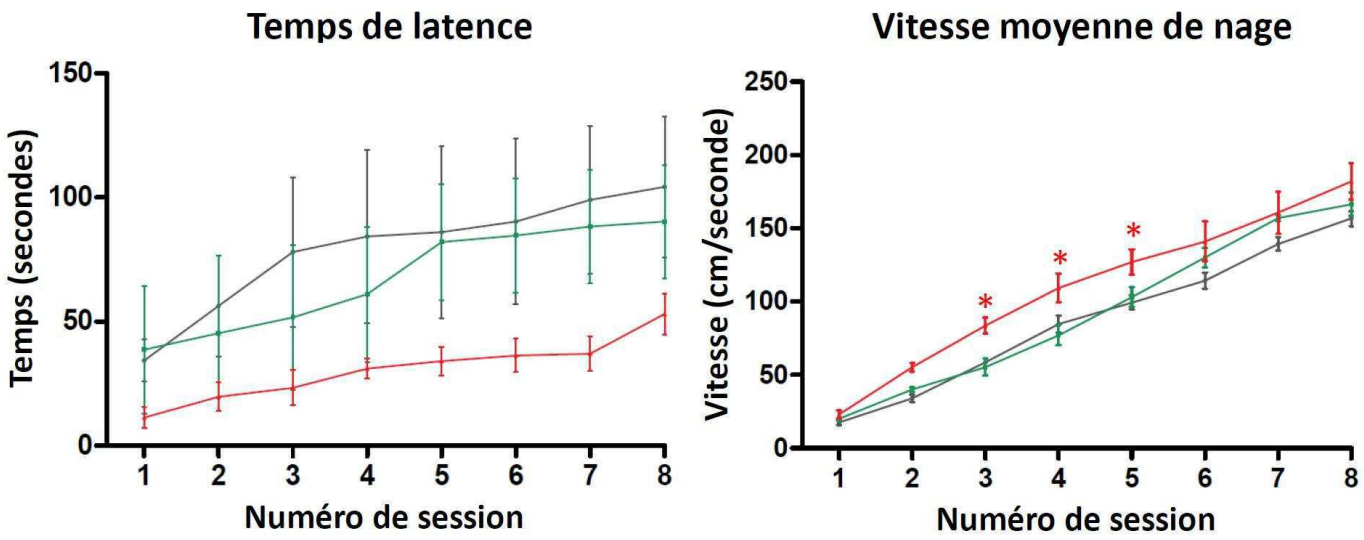


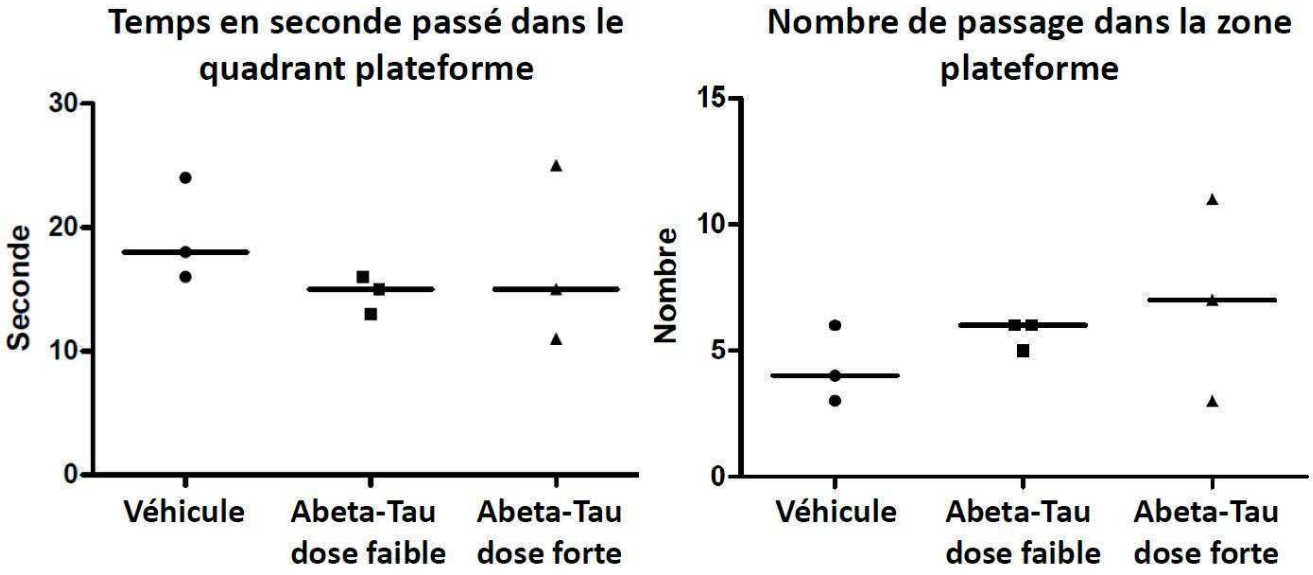
Figure 39 : Marquage du peptide Aβ par l'anticorps 4G8.

Les dépôts de peptide sont observés entre la couche CA1 et le corps calleux. Le schéma de cerveau de rat (à droite) représente la position des dépots (en vert).



<u>Figure 40</u> : Résultats de la phase d'apprentissage du test de mémoire.

Abeta-Tau dose faible : AAV-Tau à 2,1 .10^6 particules.
Abeta-Tau dose forte : AAV-Tau à 2,1 .10^8 particules.
Peptide Aβ42 : 2 nmoles pour les deux groupes Abeta-Tau.
Les parametres presentes sont le temps de latence (a gauche) et la vitesse moyenne de nage (à droite). Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$ par comparaison au groupe Véhicule. N=3 pour chaque groupe.



<u>Figure 41</u> : Résultats du test de rétention.

Chape point (rond, carré ou triangle) représente une valeur obtenue pour un animal. Chaque trait noir représente la médiane obtenue pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). N=3 pour chaque groupe.

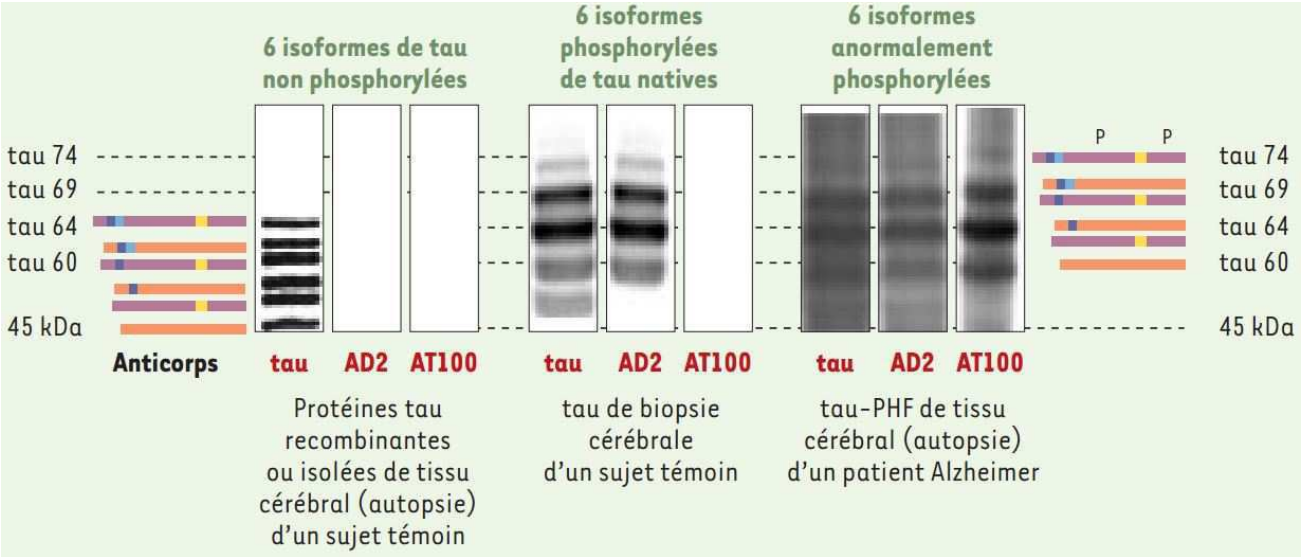
6.3.3. Evaluation de la mémoire

Phase d'apprentissage :

Les traitements Abeta-Tau dose faible et dose forte n'ont induit aucun effet significatif sur le temps de latence lors des huit sessions de la phase d'apprentissage (**figure 40**). Seulement une tendance à la baisse du temps de latence est observée avec le groupe Abeta-tau dose forte qui est due, en grande partie, à l'écart observé lors du premier passage. Cet écart s'explique notamment par le fait que plusieurs animaux du groupe Abeta-Tau dose forte, ont trouvé la plateforme, lors de la première session, en seulement quelques secondes (plateforme trouvée « par hasard »). Le traitement Abeta-Tau dose forte a également induit une augmentation significative de la vitesse de nage des animaux (significatif de la session 3 à la session 5 : P= 0,025, 0,015 et 0,03 respectivement). Ce dernier point peut induire une interprétation erronée des résultats obtenus avec le temps de latence. En effet, le temps de latence de plusieurs groupes, peut être comparé seulement dans le cas où les vitesses de nage de chaque groupe sont similaires.

Test de rétention :

Les traitements Abeta-Tau dose faible et dose forte n'ont induit aucun effet significatif sur les deux paramètres analysés lors du test de rétention (passage réalisé sans plateforme, 24 heures après la dernière session de la phase d'apprentissage), à savoir : le nombre de passages réalisés par les animaux au niveau de la zone virtuelle correspondant à la plateforme, et le temps total passé dans le quadrant où était initialement positionnée la plateforme (**figure 41**).



<u>Figure 42</u> : Mobilité électrophorétique des différentes isoformes de la protéine Tau et influence du niveau de phosphorylation.

La protèine Tau est marquée par l'anticorps AT100 seulement dans des extraits de PHF provenant de patient atteint de la MA.
Source : Buée et al., 2000.

6.4. Discussion

Points positifs :

Dans cette étude, nous avons choisi de tester des doses de vecteur AAV relativement faibles, en nous appuyant sur les travaux de Klein (Klein et al., 2009) qui décrivent, avec le même type de vecteur AAV à la dose de 3 $.10^9$ particules, une neurotoxicité rapide et importante (destruction de 90% des neurones en trois semaines à proximité de la zone d'injection) après une injection au niveau de la substance noire (mise au point d'un modèle de la maladie de Parkinson). L'auteur constate également une faible expression de la protéine tau humaine dans la substance noire. Il justifie alors cette faible expression, par la forte perte de neurones observée au niveau du site d'injection, l'intégrité des neurones étant nécessaire à l'expression d'un transgène. Dans notre étude, nous avons montré que l'injection de particules d'AAV sérotype 9 contenant le gène de la protéine Tau humaine présentant la mutation P301L, à la dose de 2,1 $.10^8$, permet bien d'induire une expression de la protéine Tau au niveau d'une couche de neurones de l'hippocampe, sans pour autant induire la destruction de cette couche. De plus, la protéine Tau exprimée est sous forme phosphorylée (marquage avec l'anticorps AD2), mais serait également sous forme d'agrégats (marquage avec l'anticorps AT100). En effet, l'anticorps AT100 permet de révéler des groupes phosphates présents sur des sites retrouvés seulement dans des PHF de Tau extraits de cerveaux de patients atteints de MA (Buée et al., 2000), alors que l'anticorps AD2 révèle une protéine Tau avec un certain niveau de phosphorylation qui n'est pas seulement retrouvé dans les PHF (Reig et al., 1995)(Buée et al., 2000 ; **figure 42**). Nous supposons donc que la protéine Tau phophorylée, observée en immunohistologie, se trouve sous forme d'agrégats intracellulaires. Seule une évaluation par microscopie électronique permettrait de conclure sur une structure en PHF.

L'expression et la phosphorylation de la protéine Tau semble se faire de manière progressive. En effet, nous avons observé très peu de marquage de Tau phosphorylée après deux semaines post-injection, en comparaison avec celui observé après un délai de 12 semaines post-injection. Cette progressivité a été observée par Dayton (Dayton et al., 2012b), qui décrit une expression optimale de la protéine Tau après sept semaines suivant l'injection du même vecteur (mais contenant le gène Tau humain wt) dans l'hippocampe de rats mâles Sprague Dawley. Le temps de 12 semaines a donc été choisi afin de laisser une période suffisante pour permettre l'installation d'une pathologie neurofibrillaire pouvant induire des perturbations de la mémoire. Cette durée de trois mois est retrouvée dans les travaux de Ramirez (Ramirez et al., 2011), qui constate un déficit de la mémoire de travail chez des rats mâles Sprague Dawley ayant reçus une injection bilatérale dans le cortex entorhinal, d'un vecteur AAV2 contenant le gène tau humain muté (P301L).

Concernant les dépôts de peptide Aβ, nous avons validé le fait que les agrégats de ce peptide ne sont pas éliminés dans le cerveau des rats, même après une durée de 12 semaines, ce qui n'était pas décrit dans la littérature compte-tenu du faible nombre de travaux s'intéressant à des effets à long terme d'une injection de peptide Aβ chez le rongeur.

Points négatifs :

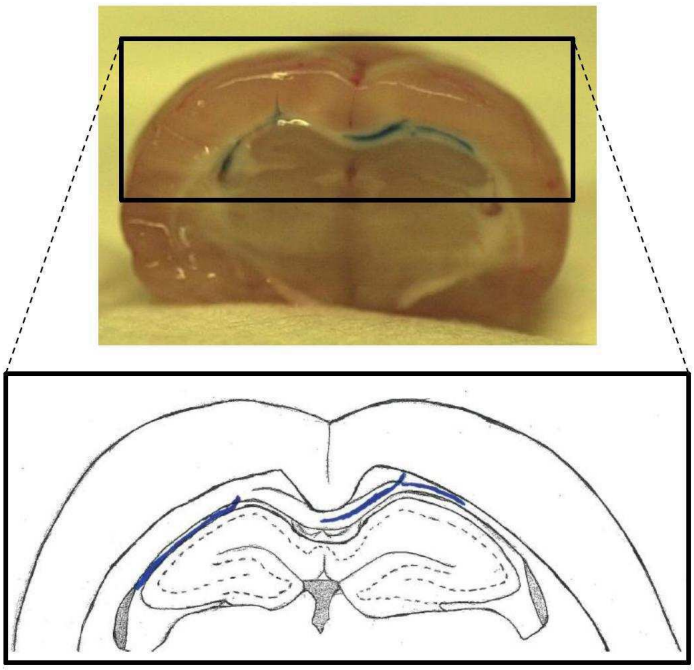
Aucune perturbation de la mémoire n'a pu être mise en évidence. Nous expliquons ce manque d'effet par plusieurs raisons :

- Nous avons observé peu de cellules marquées positives à la protéine Tau phosphorylée, même à la dose de $2,1 .10^8$ particules de vecteur.
- Nous n'avons pas constaté de modification morphologique des couches de l'hippocampe, ce qui nous permet de dire que les lésions induites par les injections intracérébrales n'ont pas provoqué d'importantes pertes neuronales.
- L'emplacement des dépôts de peptide Aβ (entre cortex pariétal et couche CA1) observés, nous a permis de constater que le site d'injection ne correspond pas à l'endroit désiré. Les injections semblent avoir été réalisées en dehors de l'hippocampe.
- Plusieurs rats ont trouvé la plateforme en quelques secondes, dès le premier passage dans la piscine. Nous supposons que nous avons utilisé une piscine de taille non adaptée aux rats. Une piscine de taille insuffisante, induirait une probabilité importante que les rats trouvent la plateforme par hasard, ce qui rendrait impossible toutes interprétations. D'après Puzzo, la piscine doit avoir un diamètre de 190 cm pour être adaptée à des rats (Puzzo et al., 2014).

Points d'améliorations à apporter lors des prochaines expériences :

Suites aux différentes imperfections constatées lors de ces premiers travaux, plusieurs étapes de mise au point semblaient nécessaires avant de réaliser une nouvelle tentative de production d'un modèle de MA. Les différents points à améliorer concernent :

- La recherche de coordonnées d'injection stéréotaxique permettant de réaliser des injections dans l'hippocampe de manière reproductible.
- Le choix d'une dose de particules d'AAV Tau qui permettrait de produire un plus grand nombre de lésions de type neurofibrillaire ainsi qu'une atteinte morphologique de la couche CA1 de l'hippocampe.
- La mise au point d'une procédure d'évaluation de la mémoire plus sensible et limitant le phénomène de hasard et le biais d'interprétation lié à la vitesse de nage.



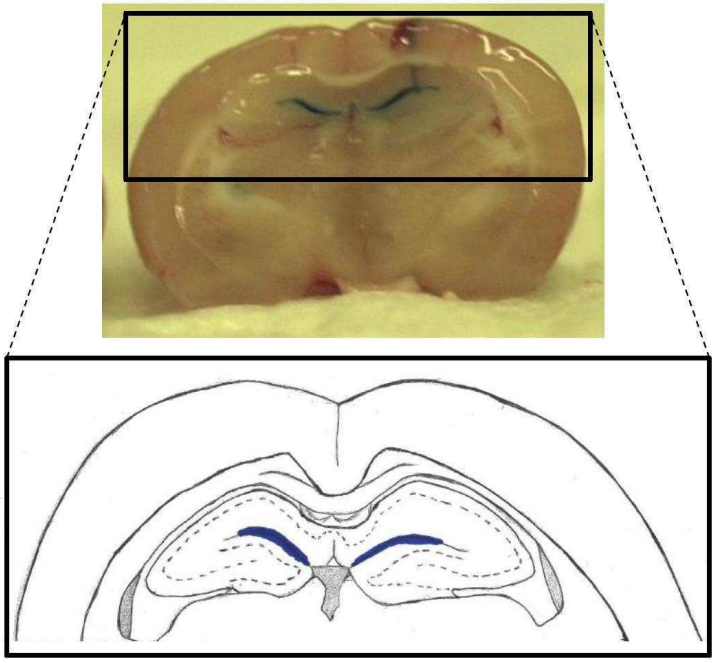
Coordonnées d'injections relatives au point bregma :

- **AP - 3,6**
- **L +/- 2**
- **P - 2,8**

Aiguille utilisée :
Hamilton 26G type 3

<u>Figure 43</u> : Site d'injection de l'étude de mise au point.

Colorant bleu Evans observé entre la couche CA1 et le cortex pariétal, après injection aux coordonnées stéréotaxiques utilisées lors de l'étude de mise au point.



Coordonnées d'injections relatives au point bregma :

- **AP - 4**
- **L +/- 2,6**
- **P - 4,5**

Aiguille utilisée :
Hamilton 26G type 5

<u>Figure 44</u> : Site d'injection validé pour les prochaines expériences.

Colorant bleu Evans observé au niveau de la fissure de l'hippocampe, après recherche de coordonnées stéréotaxiques et changement d'aiguille Hamilton.

7. Etapes de mise au point

7.1. Injection intrahippocampique

Des injections intracérébrales d'une solution de Bleu Evans (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) dilué dans une solution de NaCl 0,9% (Cooper, Melun, France), sont réalisées chez des rats males Sprague Dawley d'environ 300g, afin de déterminer des coordonnées d'injections permettant de cibler l'hippocampe de manière reproductible. La même procédure chirurgicale que celle utilisée dans l'étude précédente est réalisée, excepté que l'animal est anesthésié à l'aide d'une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique à 60 mg/kg (60 mg/kg, pentobarbital à 54,7 mg/mL, Ceva Santé Animale, Libourne, France). Suites aux deux injections bilatérales, l'animal est immédiatement sacrifié et son cerveau est prélevé. Une coupe frontale du cerveau est alors réalisée dans l'alignement des deux sites d'injections afin de visualiser la zone du cerveau colorée en bleu.

Le premier essai d'injection a été réalisé avec les mêmes coordonnées que celles utilisées lors de l'étude précédente. La position du colorant retrouvé dans le cerveau confirme les observations réalisées en immunohistochimie avec le peptide Aβ : les injections sont réalisées soit dans le corps calleux, soit entre le corps calleux et l'hippocampe (**figure 43**).

Par la suite, plusieurs essais d'injection sont réalisés en augmentant millimètre par millimètre la coordonnée de profondeur. Le colorant était alors observé, soit au dessus de l'hippocampe (dorsal), soit en dessous de l'hippocampe (ventral), ou soit dans un espace correspondant à la fissure hippocampique (**figure 44**). Dans tous les cas, le colorant n'a jamais été retrouvé de manière spécifique dans la couche CA1 de l'hippocampe.

Nous avons alors mis en cause le matériel utilisé et en particulier l'aiguille Hamilton servant à réaliser les injections. Une aiguille plus fine que celle utilisée (26G) ne permettant pas d'injecter le peptide Aβ42 pré-agrégé (substance visqueuse pouvant boucher une aiguille trop fine), le seul paramètre que nous avons pu faire varier est le type de pointe d'aiguille utilisé (**figure 45**) : type 3 (aiguille sans biseau précédemment utilisée) ; type 4 (aiguille avec biseau) ; type 5 (aiguille conique avec orifice de sortie latéral). Nous avons alors obtenu les mêmes résultats avec ces différentes pointes (pas de possibilité de cibler spécifiquement la couche CA1). En revanche, nous avons constaté que les aiguilles de type 5, permettaient de cibler précisément la fissure hippocampique, avec des coordonnées de profondeur (P) différentes de quelques dixièmes de millimètres. Nous avons également constaté que le colorant se répandait à travers cet espace, mais restait relativement bien confinés à l'hippocampe. Nous avons alors pris la décision de cibler cet espace pour les prochaines études de développement de notre modèle.

Figure 45 : **Différents types de pointe d'aiguille Hamilton utilisés pour les injections intracérébrales.**

Source : www.hamiltoncompany.com

<u>Figure 46</u> : Photographie du dispositif de Radial Arm Water Maze

Les essais d'injections suivants ont alors concerné la fissure hippocampique, dans le but de rechercher des coordonnées permettant d'obtenir le moins d'échecs possibles. Après plusieurs tentatives, nous avons choisi les coordonnées suivantes (**figure 44**) :

- ⇨ **AP - 4 mm**
- ⇨ **L ± 2,6 mm**
- ⇨ **P – 4,5 mm**

Du fait que la zone d'injection corresponde à un espace et non au parenchyme et dans le but de raccourcir le temps de chirurgie, nous avons également modifié la procédure d'injection en passant à un débit de 2 µL/min et en laissant l'aiguille en place seulement 2 minutes après injection (au lieu de 5 minutes précédemment). Un total de 20 injections de colorant a été réalisé avec cette nouvelle procédure. Nous avons alors obtenu un taux de réussite de 100%. Ce taux de réussite s'explique notamment par le fait que des injections réalisées à une profondeur de - 4,4 mm ou de - 4,6 mm permettent d'obtenir le même résultat. Cette marge d'erreur admissible pourrait, par exemple, compenser une éventuelle hétérogénéité inter-individus.

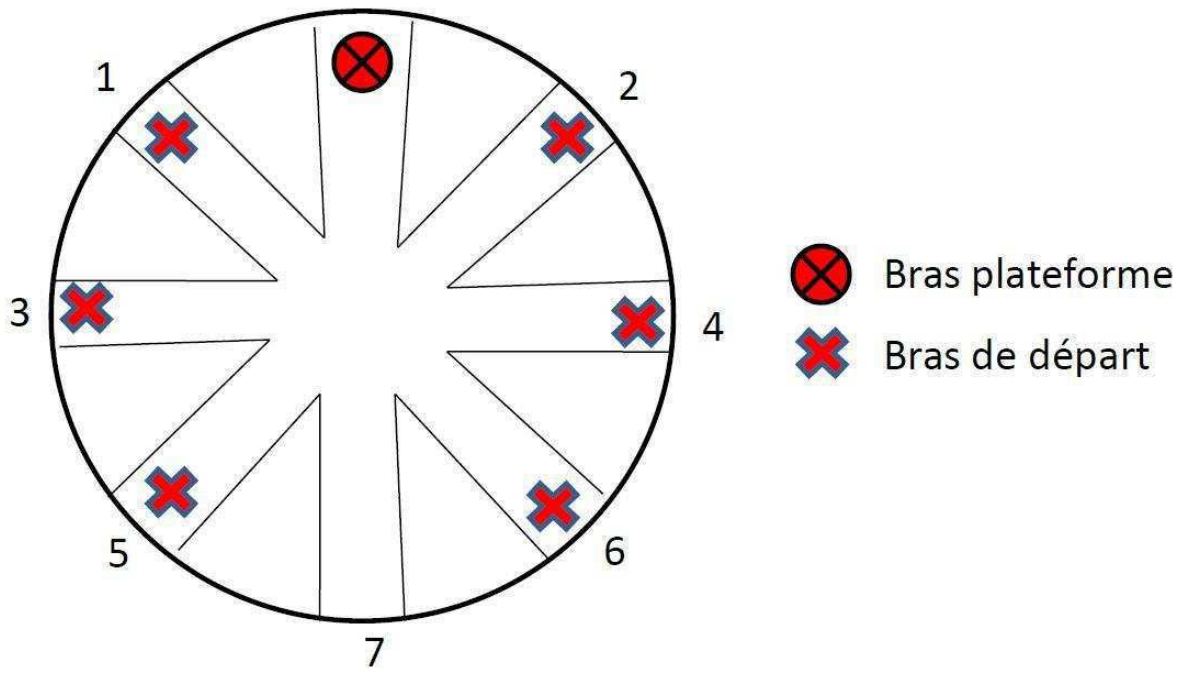
Cette mise au point nous a permis de valider une nouvelle procédure d'injection reproductible qui sera utilisée pour l'ensemble des expériences suivantes.

7.2. Validation d'un test de mémoire à l'aide d'une substance de référence

Afin de mettre au point une nouvelle procédure d'évaluation de la mémoire, nous avons utilisé une substance de référence connue pour ses effets amnésiants. Il s'agit de la scopolamine qui est un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques et dont les effets sur la mémoire sont proches de ceux rencontrés dans la MA (voir chapitre 2.2.2). Nous avons également choisi d'utiliser le dispositif du RAWM (Radial Arm Water Maze), car il permet de réaliser une évaluation de la mémoire en comptant un nombre d'erreurs commises par un animal (nombre d'entrées dans les mauvais bras) et donc de limiter un éventuel biais d'interprétation lié à la vitesse de nage. Ce type de dispositif permet également de différencier la mémoire de travail de la mémoire de référence dans un même protocole. Or la mémoire de travail semble être plus spécifique des lésions de l'hippocampe (voir chapitre 3.1.3.2). Enfin, l'adjonction de bras dans une piscine devrait permettre de limiter le fait que des animaux trouvent la plateforme «par hasard » dès les premières sessions, sans pour autant utiliser une piscine de plus grande taille.

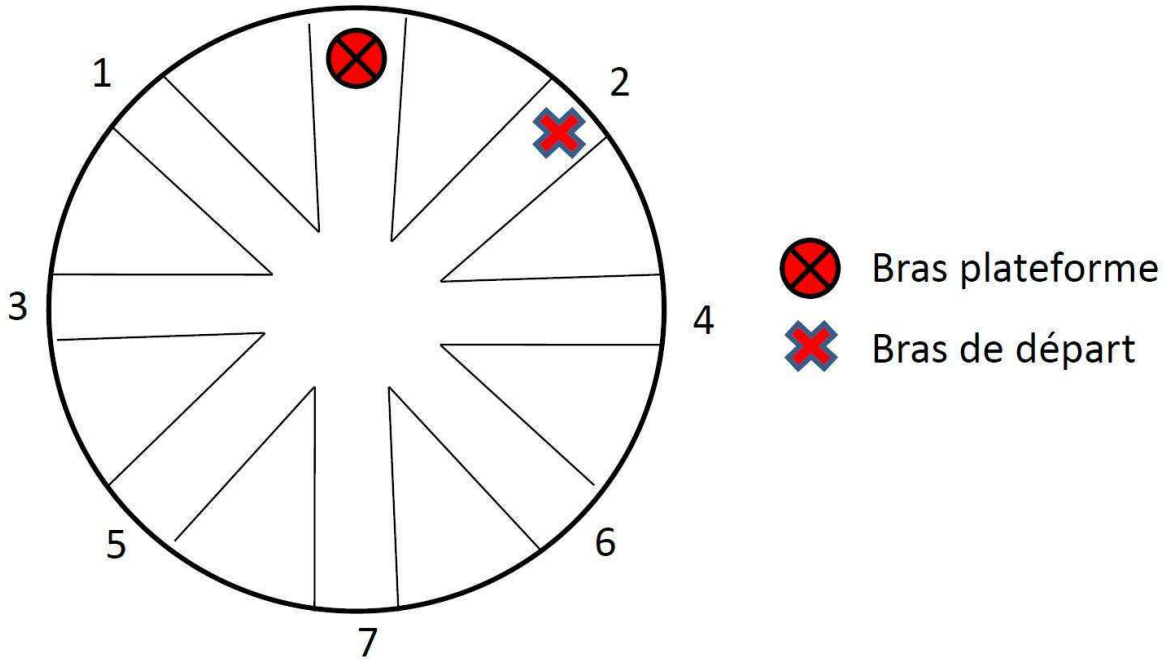
Le dispositif utilisé se compose d'une piscine circulaire de 120 cm de diamètre et de 56 cm de hauteur. Des plaques de PVC sont ajoutés afin d'obtenir huit couloirs de même taille, rayonnant autour du centre de la piscine (**figure 46**). La piscine est remplie d'eau (40 cm de hauteur) rendue opaque par l'ajout de quelques millilitres d'encre de chine. La température de l'eau est contrôlée régulièrement : elle est comprise entre 18 et 22°C. Une plateforme de couleur noire, placée à l'extrémité d'un des huit bras et immergée sous 1,5 cm d'eau, constitue l'échappatoire. Des repères visuels, permettant aux animaux de s'orienter, sont disposés autour de la piscine.

Les animaux utilisés lors de ces expériences de mise au point sont des rats males Sprague Dawley d'environ 250g provenant de l'éleveur Janvier (Le Genest Saint-Isle, France). Les animaux sont divisés en trois groupes de huit rats chacun :



<u>Figure 47</u> : Schéma du premier protocole d'évaluation de la mémoire utilisant le RAWM.

La position de la plateforme est fixe pour l'ensemble des sessions. La position de départ est changée avant chaque essai et suivant l'ordre suivant : bras n°5, 6, 3, 4, 1, 2, 3 et 4.



<u>Figure 48</u> : Schéma du second protocole d'évaluation de la mémoire utilisant le RAWM.

Le protocole est simplifié avec une unique position de départ correspondant au bras n°2 pour l'ensemble des animaux et des sessions.

- Groupe Véhicule : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de NaCl 0,9%.
- Groupe Scopolamine 0,5 : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de scopolamine à la concentration de 0,5 mg/mL.
- Groupe Scopolamine 1 : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de scopolamine à la concentration de 1 mg/mL.

Les doses de scopolamine utilisées ont été choisies en fonction de la littérature (Hodges et al., 2009)(Kay et al., 2010). La scopolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) est reconstituée dans une solution de NaCl 0,9% (Cooper, Melun, France) avant d'être injectée par voie intrapéritonéale. Les injections sont effectuées deux fois par jour, 15 minutes avant chaque passage dans le RAWM et également 15 minutes avant le test de rétention. Le passage des rats dans le RAWM se fait suivant un ordre aléatoire établit par avance.

7.2.1. Premier protocole de RAWM testé

Procédure :

La procédure de passage des animaux dans le RAWM se divise en deux étapes :

- Phase d'apprentissage : deux sessions par jour et par rat espacées de cinq heures (une le matin et une l'après-midi), pendant quatre jours :

  - La plateforme est placée dans l'un des bras du labyrinthe (« bras plateforme »). La position de cette plateforme reste fixe pendant toute la durée de la phase d'apprentissage.
  - Au début de chaque session, le rat est placé dans un des bras ne contenant pas la plateforme (« bras erreur »). Le bras de départ est changé au début de chaque session de la phase d'apprentissage en respectant l'ordre suivant : bras n°5, 6, 3, 4, 1, 2, 3, 4 (**figure 47**).
  - Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes maximum. Si au bout des 90 secondes, la plateforme n'a pas été trouvée, le rat est conduit jusqu'à elle.
  - Le rat doit rester 30 secondes minimum sur la plateforme à chaque session. S'il saute de la plateforme avant la fin des 30 secondes, il est immédiatement reconduit jusqu'à elle.
  - A la fin du test, le rat est séché puis déposé dans sa cage.

- Test de rétention : un seul passage par rat réalisé 24 heures après la dernière session de la phase d'apprentissage.

  - Le rat est placé dans le bras n°5 du RAWM.
  - Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes.
  - A la fin du test, le rat est séché puis déposé dans sa cage

- Analyse des résultats :

Les résultats obtenus sont enregistrés et analysés de la même manière que ceux de l'étude préliminaire (avec le MWM) : les résultats sont obtenus à l'aide d'un logiciel de « tracking video » ; ceux concernant la phase d'apprentissage sont cumulés session par session et analysés à l'aide d'une ANOVA suivi d'un test de Dunnett ; ceux concernant le test de rétention sont analysés, soit à l'aide du test non paramétrique de Kruskal Wallis suivi d'un Mann-Withney, soit à l'aide d'un test de Fisher (voir ci-dessous).

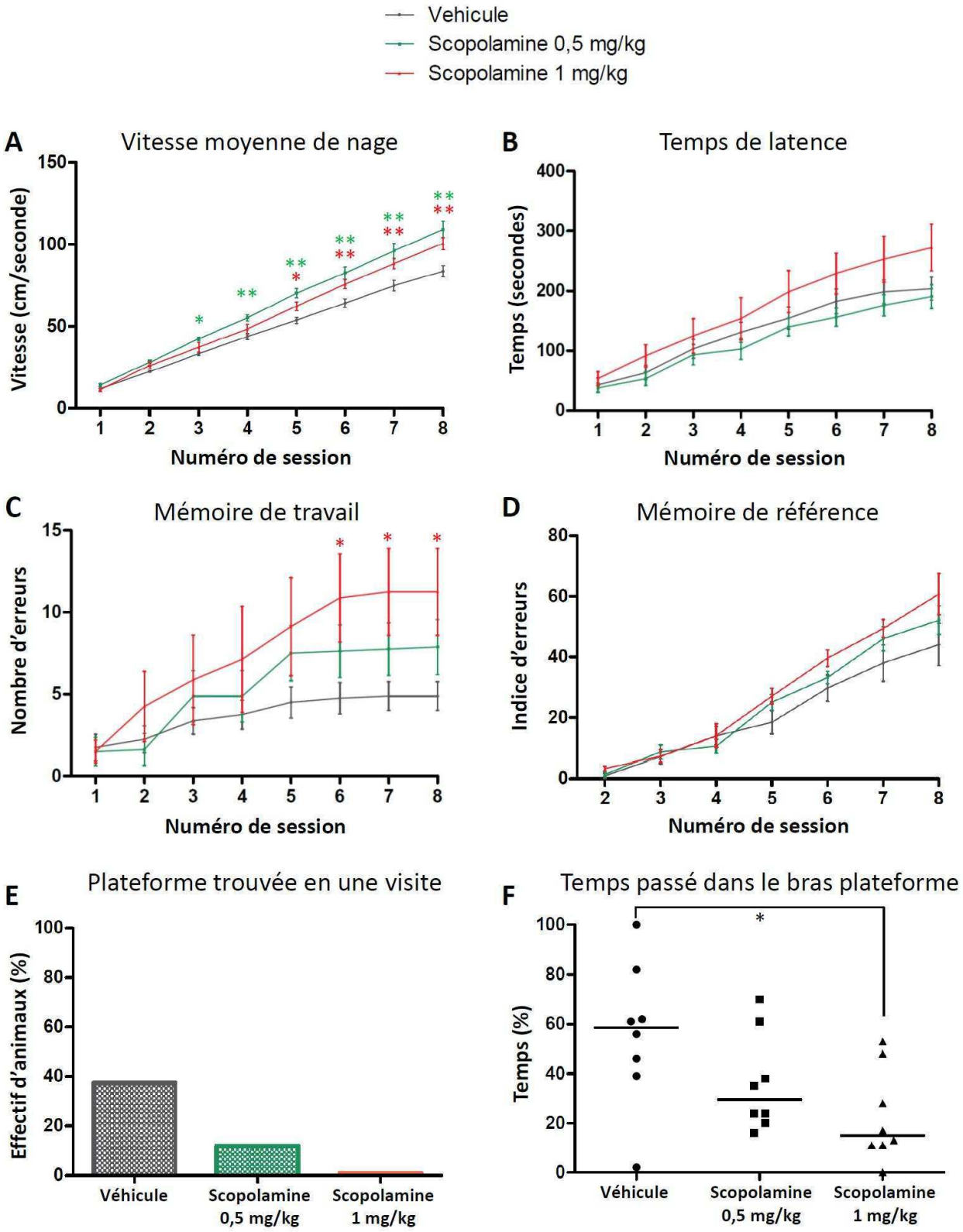
Les paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage sont :

- La vitesse moyenne de nage.
- Le temps de latence : temps nécessaire à l'animal pour trouver la plateforme.
- Le nombre d'erreurs commis par chaque rat (nombre d'entrée dans les bras sans plateforme). Ces erreurs sont divisées en deux catégories : les erreurs de mémoire de référence qui correspondent aux premières visites des bras sans plateforme, et les erreurs de mémoire de travail qui correspondent aux réentrées dans des bras déjà visités au sein d'une session (Kay et al., 2010). Les erreurs de type mémoire de référence, sont augmentées d'un coefficient dépendant du numéro de session analysée, afin d'amplifier l'importance des fautes commises lors des dernières sessions par rapport à celles commises lors des premières sessions. Les coefficients appliqués sont les suivants : session n°1 = N x 0 (N correspond au nombre d'erreurs) ; session n°2 = N x 1 ; session n°3 = N x 2 ; … ; session n°8 = N x 7. Les erreurs de type mémoire de référence sont donc présentées sous forme d'un indice et non d'un nombre d'erreurs.

Les paramètres analysés lors du test de rétention sont :

- Le pourcentage de temps passé dans le bras plateforme par rapport au temps passé dans les sept autres bras du RAWM. Ce pourcentage ne prend pas en compte le temps passé au milieu du dispositif (en dehors des bras). Du fait de son hétérogénéité, ce paramètre est présenté en médiane et est analysé à l'aide du test de Kruskal Wallis.
- L'effectif des rats de chaque groupe trouvant le bras plateforme en seule visite. Ce paramètre est analysé à l'aide du test de Fisher.

Un critère de réussite au test, lors de la phase d'apprentissage, a également été développé. Il se détermine, pour chaque rat, de la manière suivante : les animaux sortent positifs à ce critère lorsqu'ils trouvent le bras plateforme sans commettre d'erreurs lors de deux sessions consécutives. Ce critère est donc basé seulement sur le nombre d'erreurs de mémoire de référence. Nous assimilons ce critère de réussite à un apprentissage. Le taux de rats sortant positifs à ce critère est calculé pour chaque groupe et pour chaque session. Il est comparé à celui du groupe Véhicule à l'aide d'un test de Fisher.



<u>Figure 49</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à plusieurs positions de départ.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).

E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$) *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. N=8 pour chaque groupe.

Résultats :

La scopolamine induit une augmentation de la vitesse moyenne de nage aux doses de 0,5 et 1 mg/kg (**figure 49 A**). Cet effet sur la vitesse de nage rend impossible l'interprétation du temps de latence (**figure 49 B**). Seule l'analyse du nombre d'erreurs commises permet de repérer une altération de la mémoire. En effet, la scopolamine induit une augmentation du nombre d'erreurs de mémoire de travail (**figure 49 C**) et de référence (**figure 49 D**), qui est statistiquement significative à la dose de 1 mg/kg avec la mémoire de travail et à partir de la session n°6 (P= 0,036, 0,03 et 0,03 respectivement). De plus, comme décrit dans la littérature (Kay et al., 2010), cette altération de la mémoire semble bien dose dépendante.

Lors du test de rétention, la scopolamine entraine une diminution du temps passé dans le bras plateforme (effet significatif seulement avec la dose de 1 mg/kg ; **figure 49 F**), ce qui renforce l'observation faite sur l'altération de la mémoire de référence induite par cette substance et constatée lors des sessions précédentes. En revanche, seule une tendance à la baisse (non significative) est observée, sur la capacité des rats à trouver le bras plateforme en une seule visite (**figure 49 E**). Ce dernier résultat s'explique notamment par le fait que seulement trois rats du groupe Véhicule ont trouvé le bras plateforme en une visite.

Au sujet du taux de réussite au test (**figure 50**), seulement la moitié des rats du groupe Véhicule sortent positifs à la dernière session de la phase d'apprentissage (session n°8). Toutefois, une différence significative est à noter avec le groupe scopolamine à la dose de 0,5 mg/kg, ce qui laisse présager d'une diminution de la capacité d'apprentissage des rats traités avec la scopolamine.

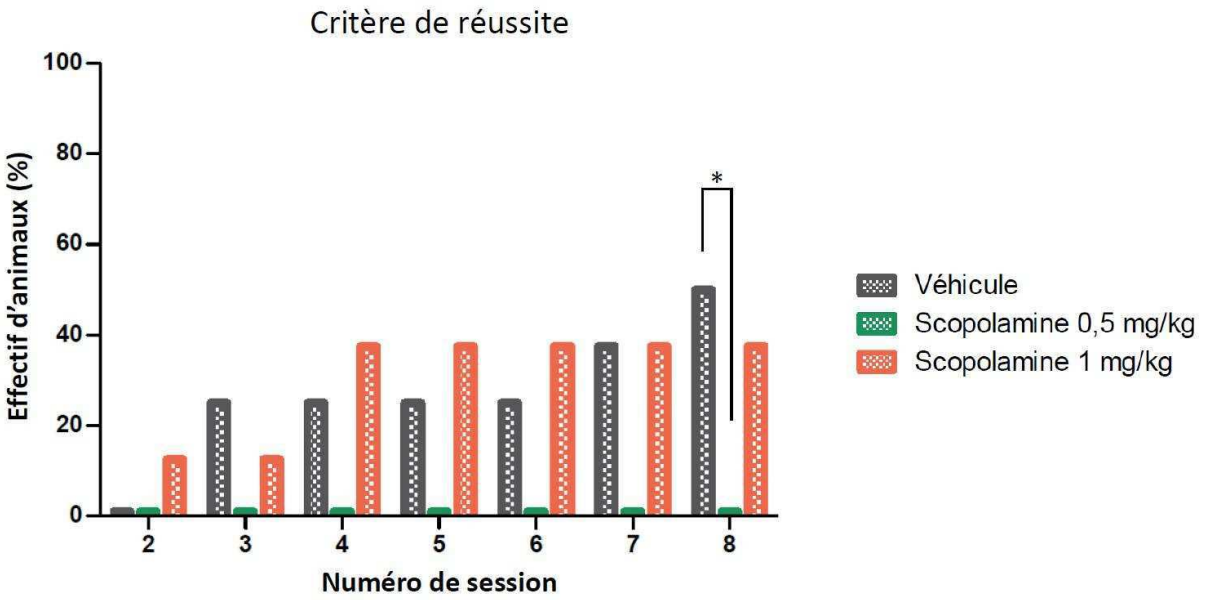
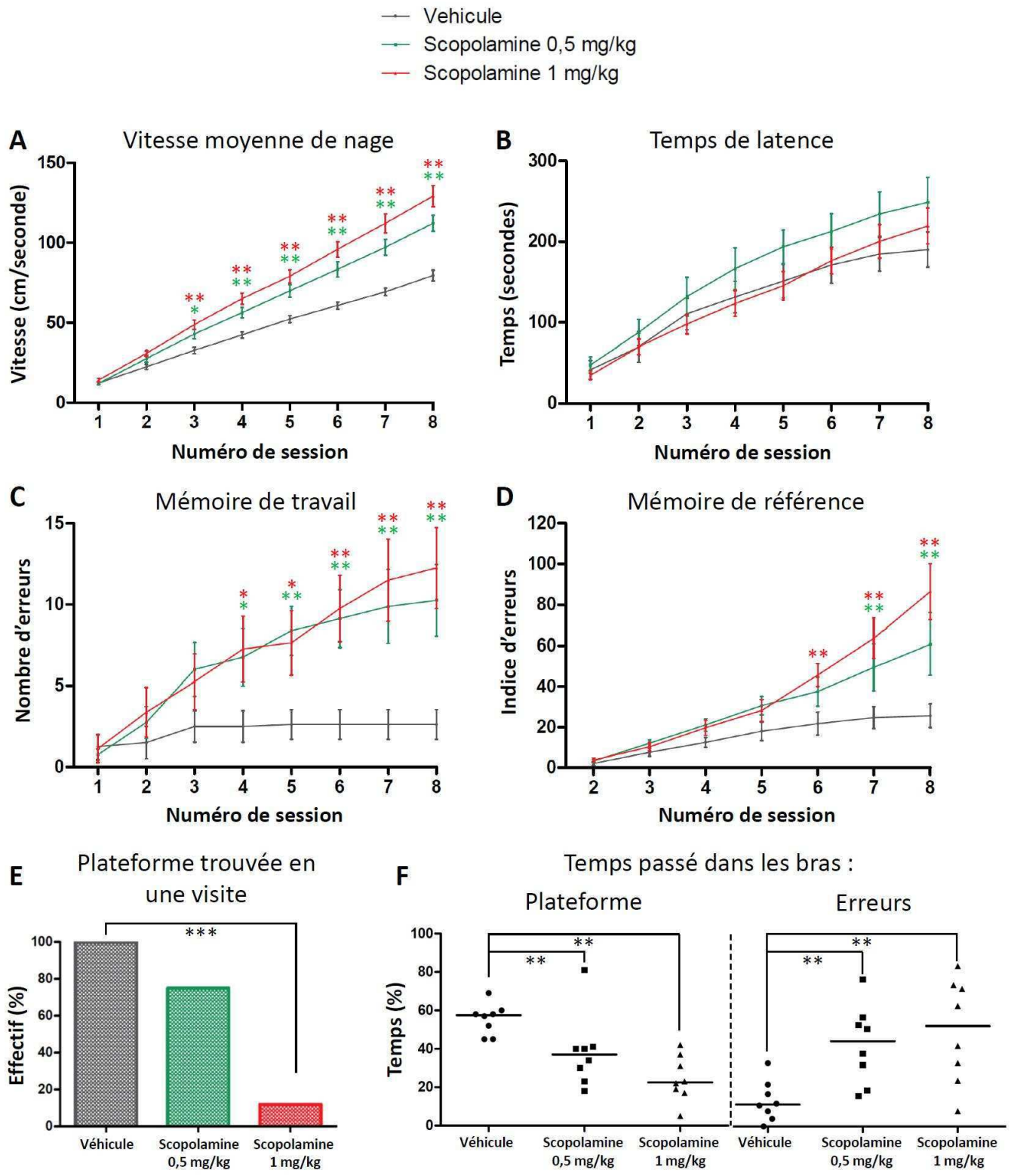


Figure 50 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. *: P≤ 0.05 par comparaison au groupe Véhicule. N=8 pour chaque groupe.



<u>Figure 51</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à une position de départ.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$).

E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme et les six bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$ par comparaison au groupe Véhicule. N=8 pour chaque groupe.

7.2.2. Second protocole de RAWM testé

Une autre procédure d'évaluation de la mémoire utilisant le RAWM a été testée. Dans cette dernière version, il s'agit de simplifier la procédure afin de limiter le risque d'erreurs commis par l'expérimentateur, et d'obtenir, chez les rats du groupe Véhicule, un meilleur taux de réussite lors de la phase d'apprentissage ainsi qu'un plus grand nombre de rats trouvant la plateforme en une seule visite lors du test de rétention.

Procédure :

La procédure de ce test est identique à celle du test précédent, excepté que le bras de départ est fixe pour tous les rats et tout au long de la phase d'apprentissage. Le bras de départ choisi est adjacent au bras plateforme (**figure 48**). Ce choix fait suite à une observation faite lors des premiers passages des animaux dans un RAWM : ils ont tendance à rentrer d'abord dans les bras opposés au bras de départ, mais très rarement dans les bras adjacents.

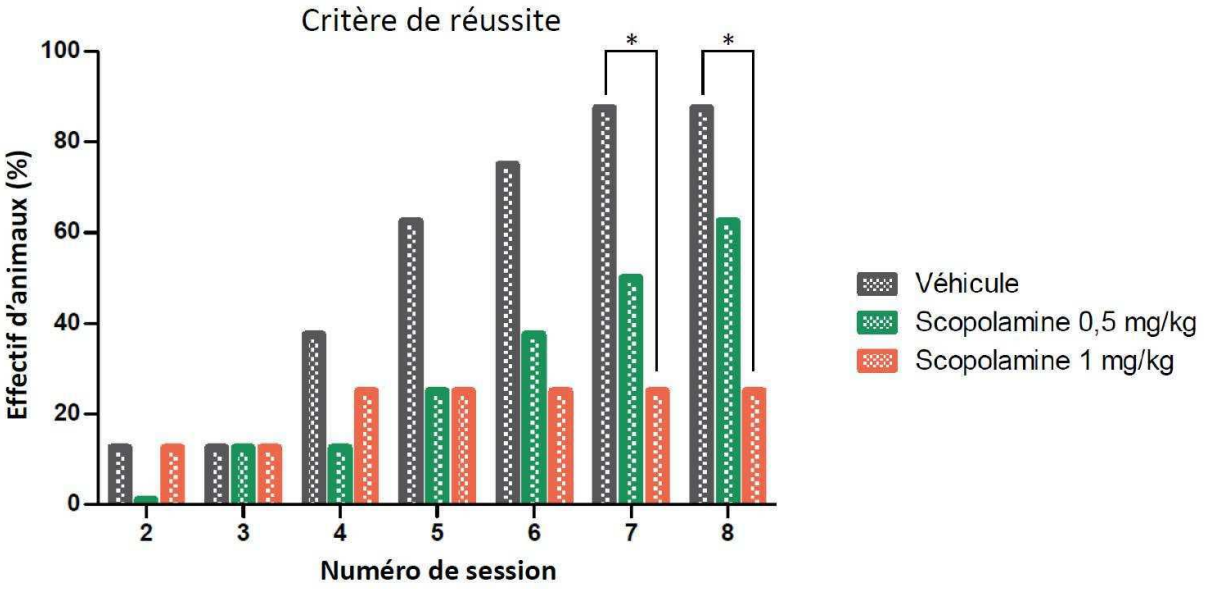
Les paramètres enregistrés et l'analyse des résultats sont identiques à ceux réalisés lors du test précédent, excepté qu'une première visite du bras de départ n'est plus considérée comme une erreur de mémoire de référence. En effet, nous avons constaté que dans ce protocole, où le bras de départ ne change pas au fil des sessions, les rats ont tendance à retourner dans le bras de départ quand ils ne trouvent pas la plateforme. Pour les mêmes raisons, au niveau du test de rétention, le temps passé dans le bras de départ est analysé de manière séparé par rapport au temps passé dans les bras erreurs.

Résultats :

L'augmentation de la vitesse moyenne de nage avec la scopolamine est confirmée et semble plus marquée avec la dose forte (**figure 51 A**). L'augmentation du nombre des erreurs de mémoire de travail (**figure 51 C**) et de mémoire de référence (**figure 51 D**) sort de manière plus marquée avec ce protocole en comparaison avec le protocole précédent (augmentation significative pour les deux doses et pour les deux types d'erreurs). Seule une différence au niveau de la mémoire de référence est observée entre les deux groupes scopolamine qui semble être plus « altérée » avec la dose la plus forte. En revanche, aucun effet significatif n'est observé sur le temps de latence (**figure 51 B**), ce qui confirme le risque de biais d'interprétation imputé à des vitesses de nage non similaires entre les groupes.

Lors du test de rétention, la scopolamine a induit, aux deux doses, une diminution du temps passé dans le bras plateforme de manière significative en comparaison avec le groupe Véhicule. Cette diminution a été en faveur d'une augmentation du temps passé dans les bras erreurs et non en faveur du bras de départ, ce qui confirme bien un effet sur la mémoire de référence (**figure 51 F**). De plus, la scopolamine à la dose de 1 mg/kg, a induit une baisse du nombre de rats trouvant la plateforme en une visite, de manière très significative (**figure 51 E**).

Au niveau du critère de réussite au test, seul un rat du groupe Véhicule ne sort pas positif (**figure 52**). Une différence significative est alors observée aux sessions 7 et 8, entre le groupe Véhicule et la scopolamine à 1 mg/kg qui induit une baisse du nombre de rats trouvant la plateforme sans commettre d'erreurs lors de deux sessions successives.



<u>Figure 52</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. *: P≤ 0.05 par comparaison au groupe Véhicule. N=8 pour chaque groupe.

7.2.3. Conclusion

Le premier protocole utilisé était inspiré d'une procédure standard d'évaluation d'une mémoire de référence retrouvé dans les tests de navigation spatiale comme le MWM (voir chapitre 3.2). Il s'est avéré qu'en simplifiant ce protocole, nous avons obtenu des effets plus marqués sur les paramètres concernant la mémoire (erreurs de mémoire de travail et de référence) avec la scopolamine. De plus, lors du test de rétention, un effet significatif est obtenu dès la dose de 0,5 mg/kg sur le temps passé dans le bras plateforme. Ces différences observées avec les deux protocoles peuvent s'expliquer par le fait que si un test est « trop compliqué » pour les rats, il ne permet pas de distinguer une « légére » détérioration de la mémoire. Au regard du score de chaque groupe Véhicule sur le critère de réussite et le nombre de rats trouvant le bras plateforme en une visite lors du test de rétention, la réussite lors du second protocole de RAWM paraît effectivement être « plus aisée » pour les animaux contrôles : 7/8 rats positifs au critère d'apprentissage contre 4/8, et 8/8 rats trouvant le bras plateforme en une visite contre 3/8. Nous avons donc choisi d'utiliser le second protocole de RAWM pour l'évaluation de la mémoire lors des expériences suivantes de mise au point d'un modèle de MA.

8. Expérience n°1

8.1. Introduction

Suite aux différentes étapes de mise au point et de validation de l'injection intrahippocampique et d'un test d'évaluation de la mémoire, une nouvelle étude, visant à caractériser l'effet d'une injection concomitante de peptide Aβ42 et d'un AAV contenant le gène de la protéine Tau humaine présentant la mutation P301L, a été réalisée. Au vu du manque de changement morphologique de la couche CA1 observé lors de l'étude préliminaire, nous avons choisi de tester une dose unique de vecteur AAV correspondant à celle utilisée dans les travaux de Klein (3 $.10^9$ particules) et qui produirait une perte neuronale importante et rapide lors d'une injection dans la substance noire de rats Sprague Dawley (Klein et al., 2009). Le fait de tester qu'une seule dose de vecteur nous a également permis de limiter le nombre de groupe de rats à quatre (Véhicule, injection de peptide Aβ, injection de l'AAV-Tau, co-injection des deux substances) et ainsi travailler sur de plus grands effectifs d'animaux par groupe. Nous avons également choisi de réaliser une évaluation de la mémoire à l'aide du RAWM à différents temps afin de suivre une évolution éventuelle des effets des différents traitements. La dose et la préparation du peptide Aβ, ainsi que la durée post-injection restent inchangées dans cette étude.

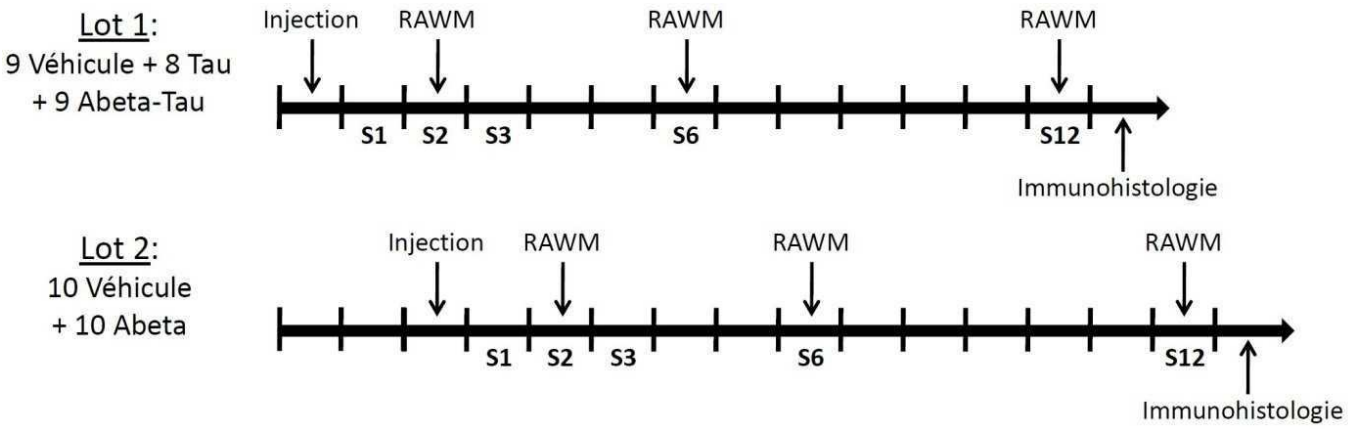
8.2. Matériels et méthodes

Procédure expérimentale :

Des rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) de 300g environ sont divisés en quatre groupes :

- **Groupe Véhicule :** 19 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale d'une solution composée de 20% d'H_2O_{UHQ} et de 80% de Ringer Lactate (Lavoisier, Paris, France).
- **Groupe Abeta :** 10 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 pré-agrégé (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Le petide Aβ est reconstitué et pré-agrégé 48 heures à 37°C, dans de l'H_2O_{UHQ} à la concentration de 2,5 nmol par microlitre. Avant l'injection, une solution de Ringer Lactate est ajoutée à la solution de peptide Aβ de manière à obtenir un ratio de 80% de Ringer Lactate et 20% d'H_2O_{UHQ}, avec une concentration finale de peptide Aβ de 0,5 nmol par microlitre.
- **Groupe Tau :** huit rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une suspension contenant 2,1 $.10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L. Cette suspension est obtenue à partir de la dilution de celle fournie par le Pr. Klein (University of Shreveport, Louisiane, USA) : suspension de 2,1 $.10^{10}$ particules diluée dans la solution de Ringer lactate à 5,25 $.10^8$ particules.
- **Groupe Abeta-Tau :** neuf rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant un mélange de 2 nmol de peptide Aβ 1-42 pré-agrégé et 2,1 $.10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L.

Les injections ont été réalisées suivant deux lots d'animaux : un lot de neuf rats du groupe Véhicule ainsi que huit rats du groupe Tau et neuf rats du groupe Abeta-Tau, puis un lot de 10 rats du groupe Véhicule et 10 rats du groupe Abeta. Les résultats d'évaluation de la mémoire, obtenus pour les différents lots, sont alors rassemblés entre-eux.



<u>Figure 53</u> : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°1

Anticorps	Clone ou fluorochrome	Classe	Espèce hôte	Cible	Dilution	Fournisseur
Primaires	/ (anti-Tau P S396)	Polyclonal	Lapin	Phosphate sur Ser 396 de Tau	1/100	Thermo Fischer Scientific, Villebon sur Yvette, France
	/ (anti-Tau P S422)	Polyclonal	Lapin	Phosphate sur Ser 422 (anti-PHF)	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	AT100	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 212 et Thr 214 de Tau (anti-PHF)	1/20	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	PHF1	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 396 et 404 de Tau	1/100	Dr. Peter Davies, Hofstra North Shore-LIJ School of Medicine, NY , USA
	WO2	Monoclonal	Souris	AA 4-10 du peptide humain Aβ	1/100	Merck Millipore, Molsheim, France
	/ (anti-GFAP)	Polyclonal	Lapin	Protéine GFAP des astrocytes	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	/ (anti-Iba1)	Polyclonal	Chèvre	AA 135-147 de la protéine humaine Iba1 des macrophages	1/100	Abcam Cambridge, Royaume-Uni
Secondaires	Alexa-488	Polyclonal	Ane	Ig de souris	1/50	Jackson Immuno Research, Villepinte, France
	RRX			Ig de souris		
	RRX			Ig de lapin		
	RRX			Ig de chèvre		

<u>Tableau 9</u> : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°1.

Ser : sérine ; Thr : thréonine

Le déséquilibre observé entre les effectifs des différents groupes s'explique également par la perte de quelques animaux lors des injections intracérébrales (surdosage lors de l'anesthésie).

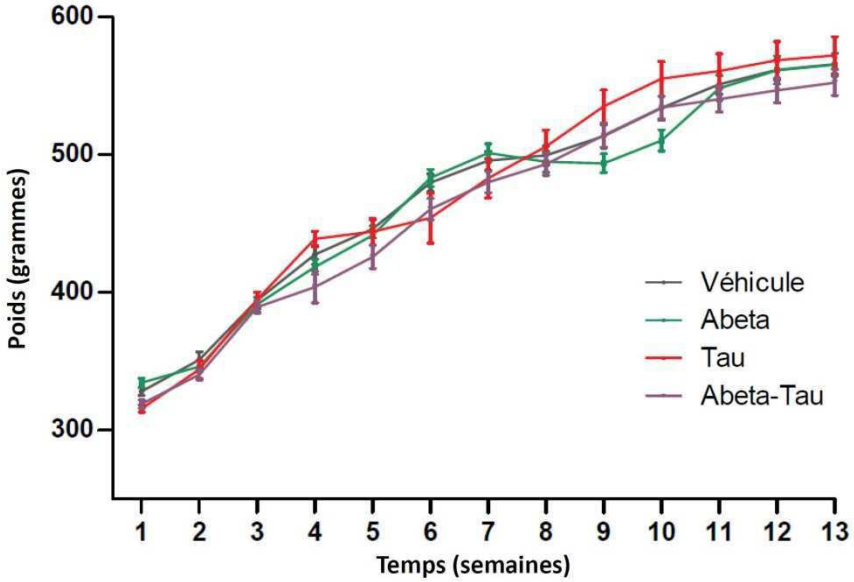
L'évaluation de la mémoire se fait selon le second protocole de RAWM (version « simplifiée »). Elle est effectuée à trois temps post-injection différents : deux semaines, six semaines et 12 semaines post-injection (**figure 53**). Afin qu'il y ait bien formation d'un nouvel apprentissage, la position de la plateforme est changée à chaque temps post-injection : bras adjacent côté droit du bras de départ à deux semaines ; bras adjacent côté gauche du bras de départ à six semaines ; bras adjacent côté droit du bras de départ à 12 semaines. Les animaux sont sacrifiés lors de la 13ème semaine post-injection afin de réaliser une évaluation des lésions histologiques par immunohistofluorescence sur coupes paraffinées.

La préparation des différentes substances injectées, ainsi que la procédure d'immunhistologie sont réalisées suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés lors de l'étude préliminaire. La liste des anticorps utilisés pour l'immunohistologie est présentée dans le **tableau 9**.

8.3. Résultats

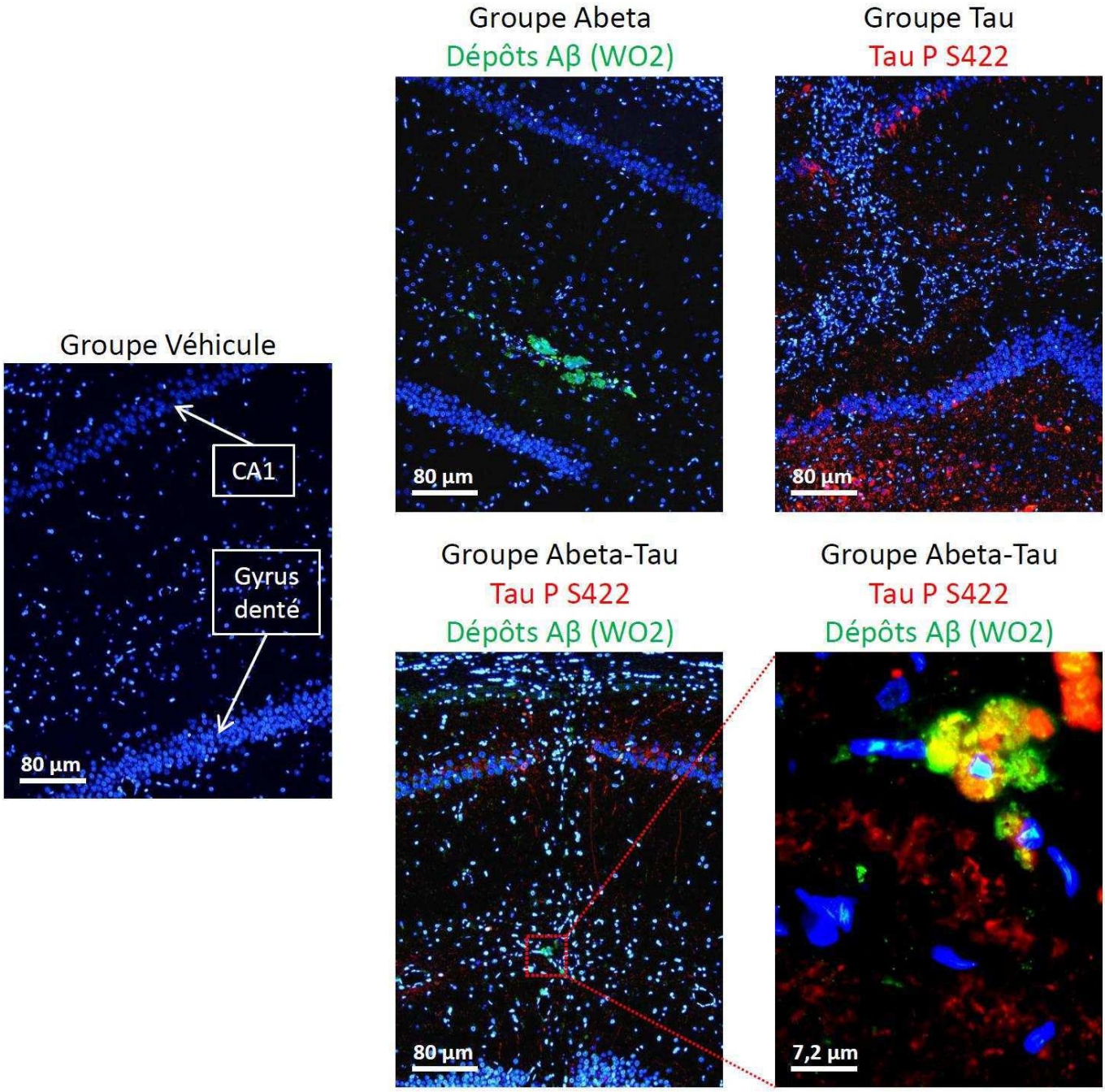
8.3.1. Suivi du poids

Les différents traitements (Abeta, Tau ou Abeta-Tau) administrés aux rats, n'induisent aucun changement au niveau de la prise de poids des animaux, en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 54**). L'effet potentiel observé lors de l'étude préliminaire (seulement avec des groupes de trois animaux), concernant la cinétique de prise de poids des animaux traités avec le peptide Aβ et l'AAV-Tau à la dose de 2,1 .10^{8} particules, n'est donc pas confirmé.



<u>Figure 54</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°1.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=19 ; Groupe Abeta : N=10 ; Groupe Tau : N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.



<u>Figure 55</u> : Co-marquage du peptide Aβ et de la protéine Tau phosphorylée au niveau du site d'injection.

Les dépôts de peptide Aβ (en vert) sont marqués par l'anticorps WO2 et la protéine Tau anormalement phosphorylée (en rouge) est marquée par l'anticorps anti-Tau P S422. La présence des deux types de lésions à proximité l'une de l'autre, est observée chez les rats du groupe Abeta-Tau.

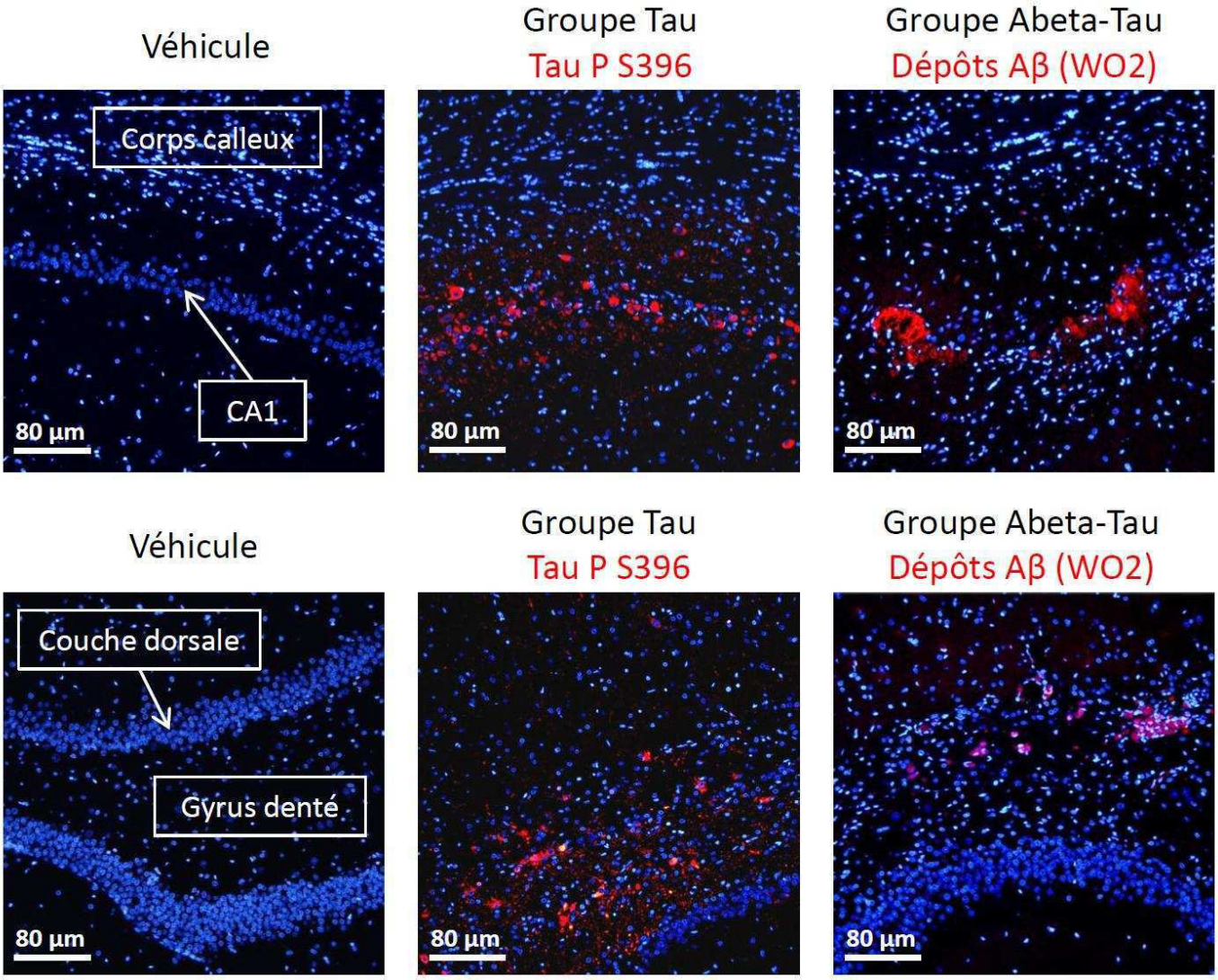
8.3.2. Observation histologique des différentes lésions

Confirmation du site d'injection :

Des dépôts de peptide Aβ sont observés après 13 semaines post-injection, chez des rats du groupe Abeta et Abeta-Tau, au niveau de la zone ciblée (fissure de l'hippocampe : entre la couche CA1 et le gyrus denté, **figure 55**), mais sont parfois également observés au niveau de la couche CA1 ou de la couche dorsal du gyrus denté (**figure 56** : groupe Abeta Tau). Les lésions de type neurofibrillaire sont essentiellement observées au sein des différentes couches de l'hippocampe (**figure 55** : groupe Tau et **figure 57**), mais des marquages de la protéine Tau phosphorylée sont également présents entre la couche CA1 et le gyrus denté (**figure 55** : groupe Tau et Abeta-Tau) sous forme de filaments et de points (aspect de fibres tortueuses). Lors de co-marquages de la protéine Tau phosphorylée et du peptide Aβ réalisés sur des coupes de cerveaux de rats du groupe Abeta-Tau, la protéine Tau phosphorylée a pu être mise en évidence à proximité de dépôts de peptide Aβ (**figure 55 :** groupe Abeta Tau), mais sans présenter l'aspect morphologique des plaques séniles (dépôt sphérique avec couronne de neurites dystrophiques). Dans tous les cas, aucun dépôt de peptide Aβ et de marquage de la protéine Tau humaine phosphorylée n'ont été observés dans les structures adjacentes à l'hippocampe (cortex pariétal, temporal et thalamus).

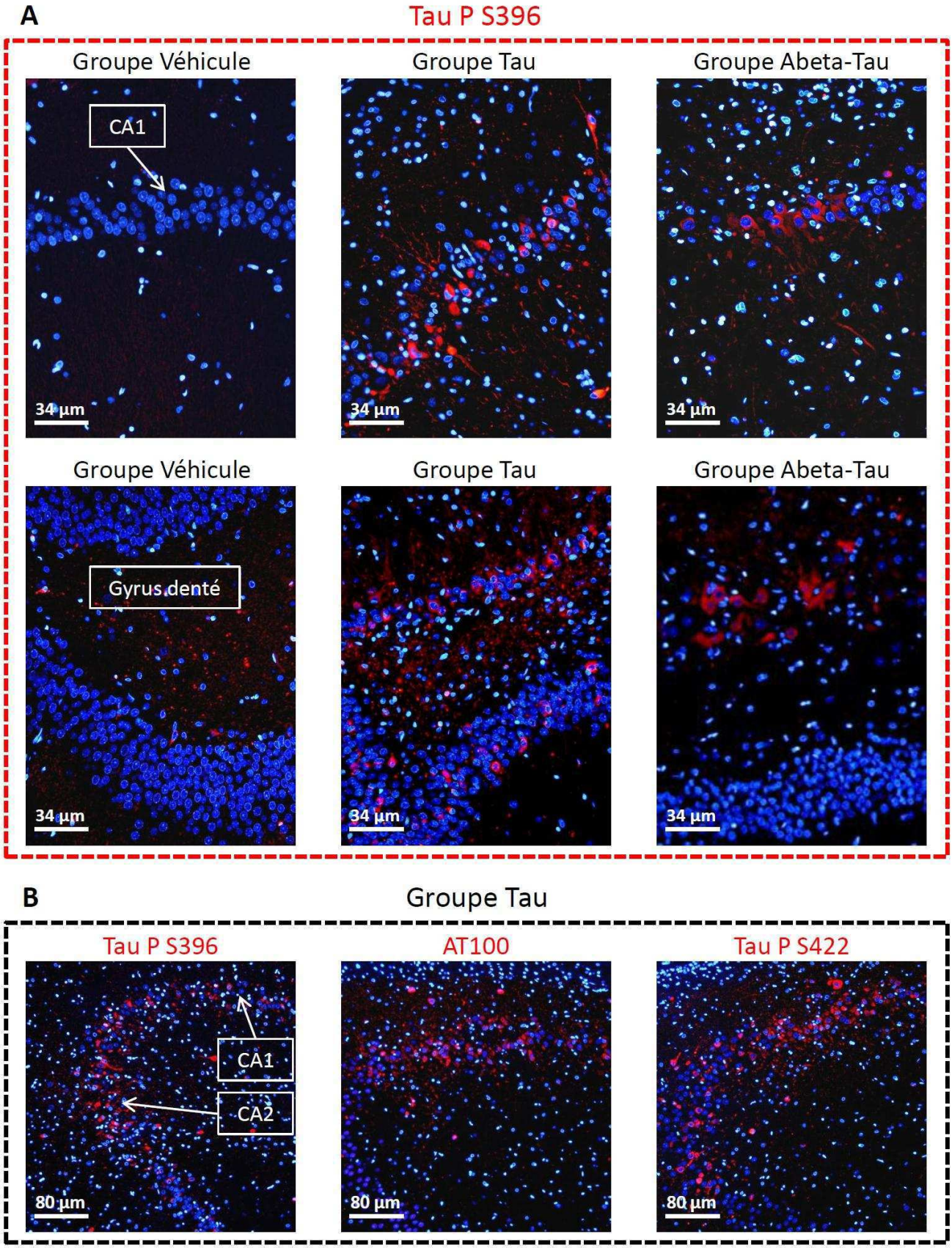
Aspect morphologique des couches neuronales de l'hippocampe :

Les couches neuronales CA1 et dorsale du gyrus denté présentent un aspect « déstructuré » quand elles sont associées à un marquage important de la protéine Tau phosphorylée (lésions neurofibrillaires), ou à la présence de dépôts diffus de peptide Aβ en leur sein (**figure 56**). Ces modifications ont été observées essentiellement avec les groupes Tau et Abeta-Tau. Chez le groupe Abeta, seule la couche dorsale du gyrus denté a été retrouvée « lésée » dans quelques cas (**figure 58** dépôts Abeta). Les autres couches (CA2, CA3 et la couche ventrale du gyrus denté) ne semblent pas présenter de modification morphologique particulière en comparaison avec les coupes réalisées chez le groupe Véhicule.



<u>Figure 56</u> : Aspect morphologique de la couche CA1 et du gyrus denté.

Les couches neuronales de l'hippocampe sont observées grâce au marquage (en bleu) des noyaux au DAPI. La présence de l'accumulation de protéine Tau phosphorylée (marquée par l'anticorps anti-Tau P S396, en rouge) ou de dépôts de peptide Aβ (marqué par l'anticorps WO2, en rouge) au niveau des couches CA1 et gyrus denté, s'accompage d'une dégradation de ces dernières.



<u>Figure 57</u> : Lésions de type neurofibrillaire.

A, immunomarquage de la protéine Tau phosphorylée (anticorps anti Tau P S396) au niveau de la couche CA1 et du gyrus denté, chez les rats ayant reçu une injection du vecteur AAV-Tau P301L à la dose de 2,1 .10^9 particules.

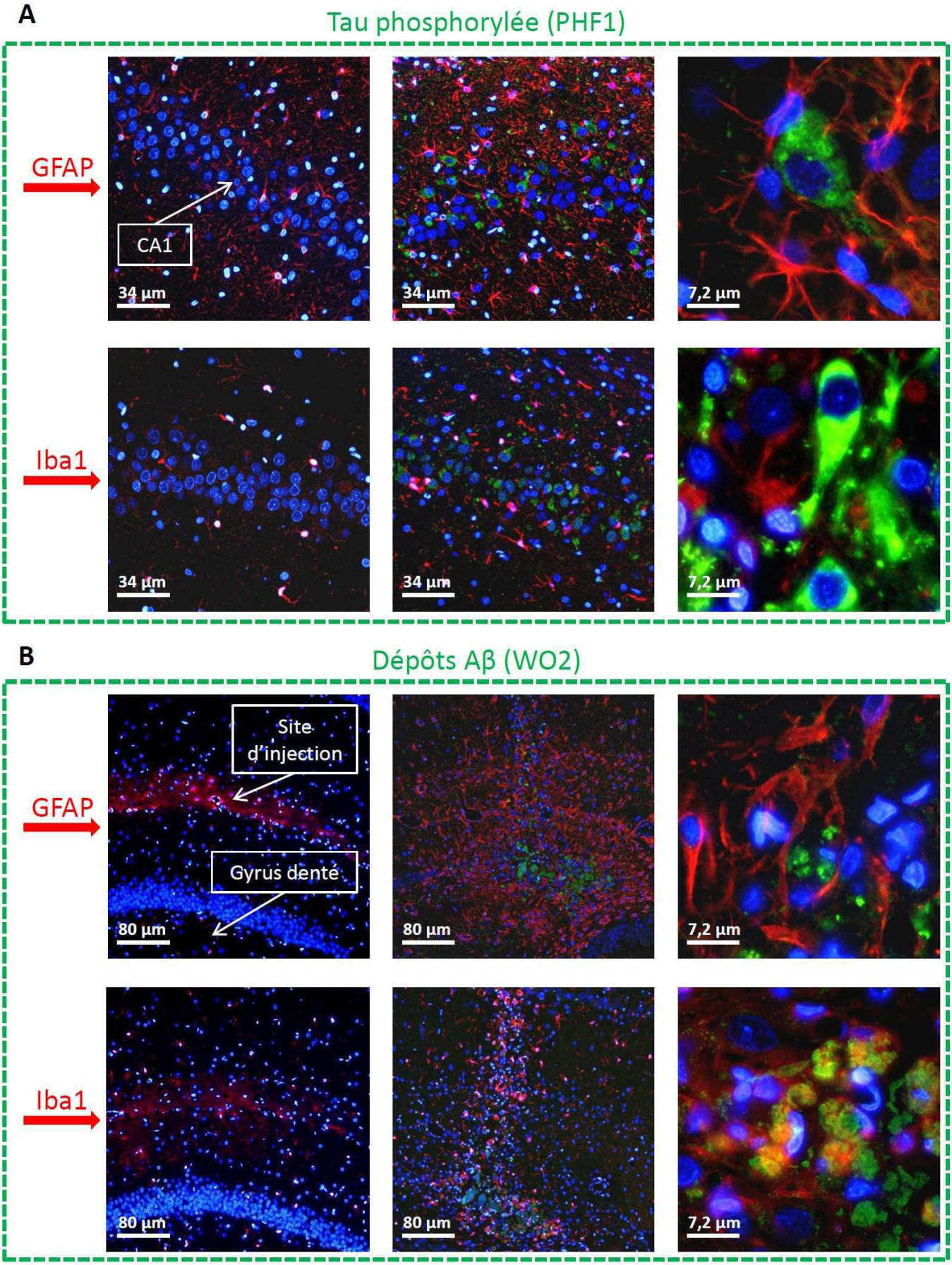
B, immunomarquage de la protéine Tau phosphorylée au niveau de quatre sites de phosphorylation différents dont trois considérés comme pathologiques : sérine 396 (Tau P S396) et sérine 212, thréonine 214 (AT100), sérine 422 (Tau P S422) pour les pathologiques.

Lésions de type neurofibrillaires :

Contrairement à l'étude préliminaire, les lésions de type neurofibrillaire (marquage de la protéine tau phosphorylée autour du noyau et dans les prolongements neuritiques) sont observées dans toutes les couches de l'hippocampe (CA1, CA2, CA3 et GD) chez les rats ayant reçu une injection de vecteur AAV-Tau (sans le peptide Aβ) dans ce nouveau site d'injection et avec une dose 10 fois supérieure (**figure 57 A et B**). De plus, le nombre de cellules marquées par les anticorps anti-Tau phosphorylée, au niveau de la couche CA1, semblent plus nombreuses que lors de l'étude précédente. En revanche, ces marquages semblent moins nombreux avec le groupe Abeta-Tau qu'avec le groupe Tau (non quantifié). Par exemple, nous n'avons pas observé de marquage Tau phosphorylée dans la couche CA2 avec le groupe Abeta-Tau.

Différents anticorps ont été utilisés afin de marquer plusieurs sites de phosphorylation de la protéine Tau. Nous avons testé, en tout, cinq sites de phosphorylation différents qui ont tous donné les mêmes types de marquage chez les rats ayant reçu une injection de vecteur AAV (**figure 57 B**). Les anticorps anti-Tau P S396 et PHF1 sont dirigés contre une protéine Tau humaine présentant un certain niveau de phosphorylation qui peut être retrouvé chez des personnes atteints de MA mais également chez des personnes non malades. Les anticorps anti-Tau P S422 et AT100 sont, quant à eux, dirigés contre des sites de phosphorylation dit « anormaux » car ils sont retrouvés phosphorylés chez l'Homme, seulement dans les PHF de Tau (Buée et al., 2000)(Augustinack et al., 2002)(Troquier et al., 2012).

Les rats n'ayant pas été traités avec le vecteur AAV-Tau, présentent parfois quelques marquages de la protéine Tau phosphorylée (essentiellement sous forme de points ou de filaments), en particuliers au niveau du gyrus denté (**figure 57 :** groupe Véhicule). Ces marquages sont visualisés seulement avec l'anticorps anti-Tau P S396 qui est un anticorps polyclonal (moins spécifique qu'un anticorps monoclonal tel que l'anticorps PHF1) et qui reconnait des formes non pathologiques de la protéine Tau. Dans ce cas, il s'agit de la protéine Tau endogène des rats qui présente un fort taux de similitude avec la protéine Tau humaine (Hanes et al., 2009).



<u>Figure 58</u> : Réaction gliale associée aux deux types de lésions.

Co-marquage des atrocytes (anticorps anti-GFAP, en rouge) ou de la microglie (anticorps anti-Iba1, en rouge) avec les lésions de type neurofibrillaire (anticorps PHF1, en vert, **A**) ou de type dépôt de peptide Aβ (anticorps WO2, en vert, **B**). La colone de gauche des encadrés **A** et **B** correspond au groupe Véhicule. Les astrocytes et les cellules microgliales apparaissent sous forme réactive, à proximité des deux types de lésions.

Neuroinflammation :

Les co-marquages des cellules gliales (astrocytes et microglie) avec la protéine Tau phosphorylée ou le peptide Aβ, ont permis de mettre en évidence la présence d'astrocytes et de cellules microgliales réactives à proximité des lésions de type dépôt de peptide Aβ ou de type neurofibrillaire de Tau (**figure 58**). Ces observations sont le signe d'un effet pro-inflammatoire induit par les différentes lésions (Tau ou Aβ), persistant même au bout de 13 semaines post-injection. Le marquage de la protéine GFAP (astrocytes) semble plus intense que le marquage de la protéine Iba1 (microglie) à proximité des lésions et plus particuliérement autour des dépôts de peptide Aβ

Autres lésions :

Des dépôts de peptide Aβ ont également été observés autour de vaisseaux cérébraux chez des rats ayant reçu une injection de peptide Aβ42 (**figure 59**). Ces dépôts présentent l'aspect des dépôts amyloïdes vasculaires rencontrés dans la MA.

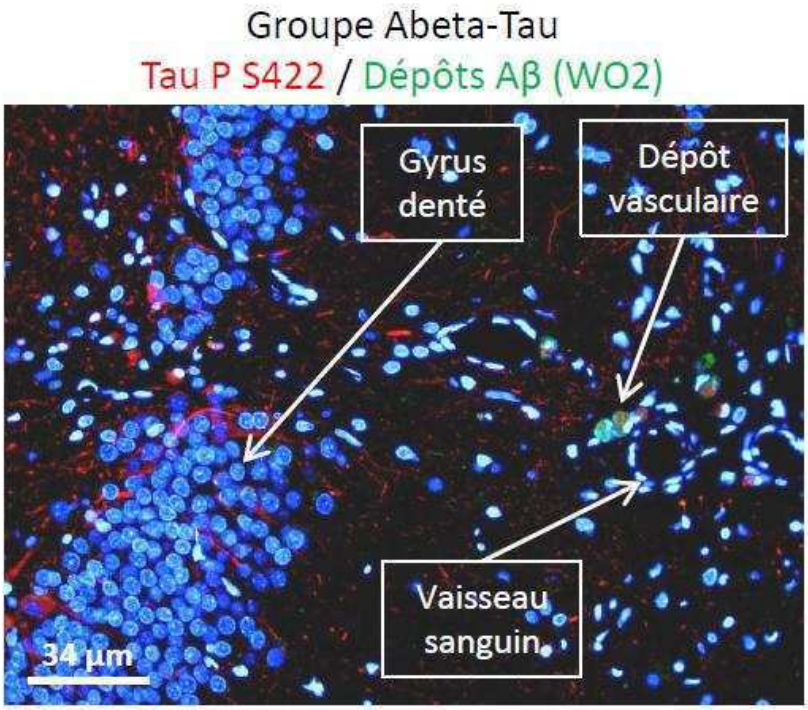
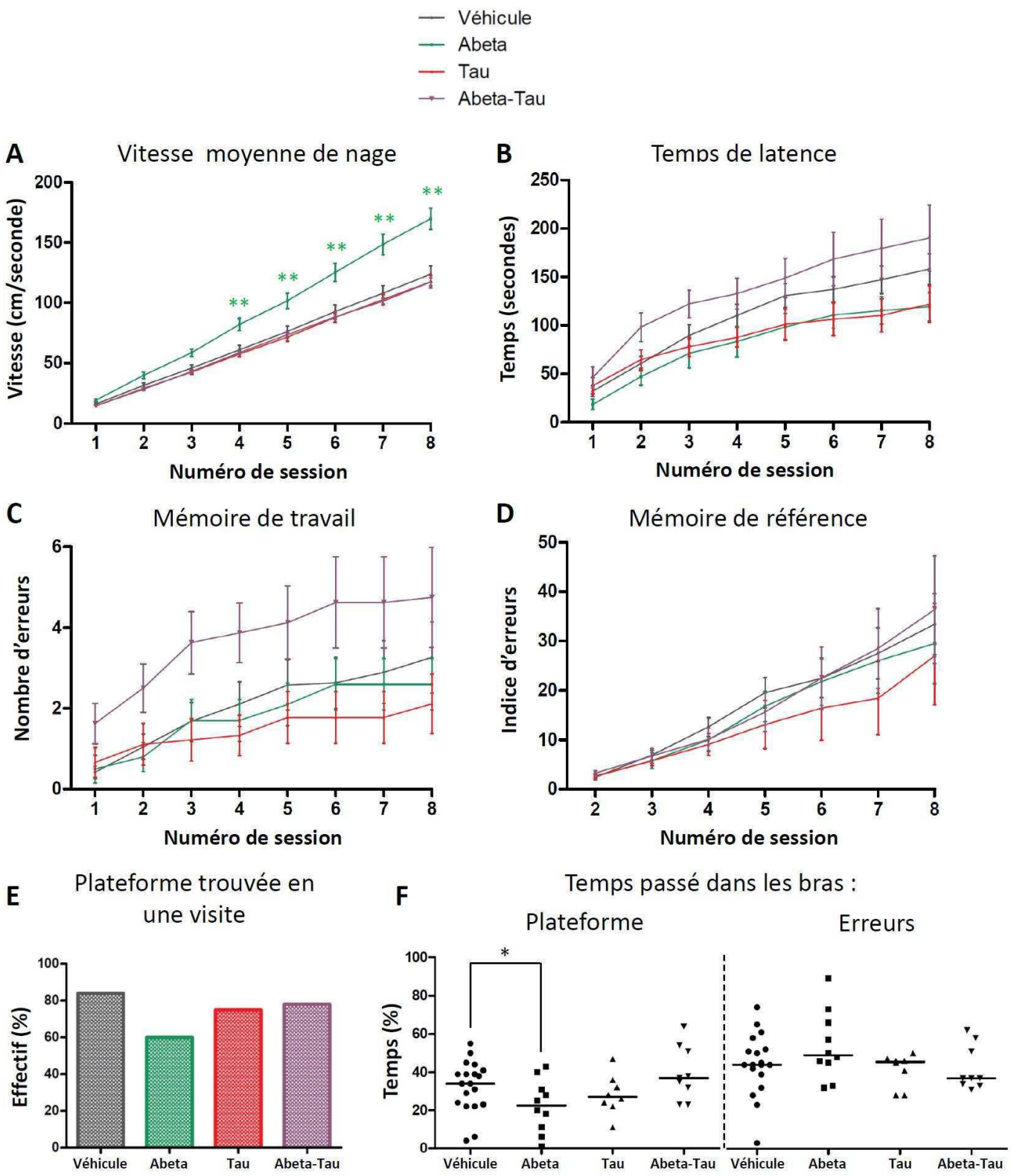


Figure 59 : Dépôt vasculaire.

Des dépôts de peptide Aβ (anticorps WO2, en vert) sont observés en périphérie de vaisseaux sanguins, visualisés au DAPI par la forme en cercle définit par des noyaux de cellules endothéliales.



<u>Figure 60</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à deux semaines post-injection.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).
E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme et les six bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.

8.3.3. Evaluation de la mémoire

Deux semaines post-injection :

L'injection du peptide Aβ42 seul a induit une augmentation significative de la vitesse de nage (significatif à partir de la session 4). Cependant, cet effet n'est pas observé avec les rats du groupe Abeta-Tau (**figure 60 A**) qui ont pourtant également reçu une injection de peptide Aβ42 et l'injection du vecteur AAV-Tau seul n'induit pas de changement sur ce paramètre. Cet effet reste donc à confirmer lors des prochaines expériences.

Une tendance à l'augmentation du nombre d'erreurs de type mémoire de travail (réentrées dans des bras déjà visités au sein d'une session) est observée seulement avec le groupe Abeta-Tau en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 60 C**).

Aucune autre modification n'a été observée avec les différents traitements en comparaison avec le groupe Véhicule lors de la phase d'apprentissage (**figure 60 et 61**). En revanche, lors du test de rétention, les rats du groupe Abeta ont passé moins de temps dans le bras plateforme que les rats du groupe Véhicule (**figure 60** F). Ce type d'effet est associé à une perturbation de la mémoire de référence (voir chapitre 3.2). Cependant, aucun changement n'a été observé sur le paramètre de mémoire de référence durant la phase d'apprentissage avec ce groupe (**figure 60 D et 61**). Encore une fois, cet effet est à confirmer lors des prochains tests.

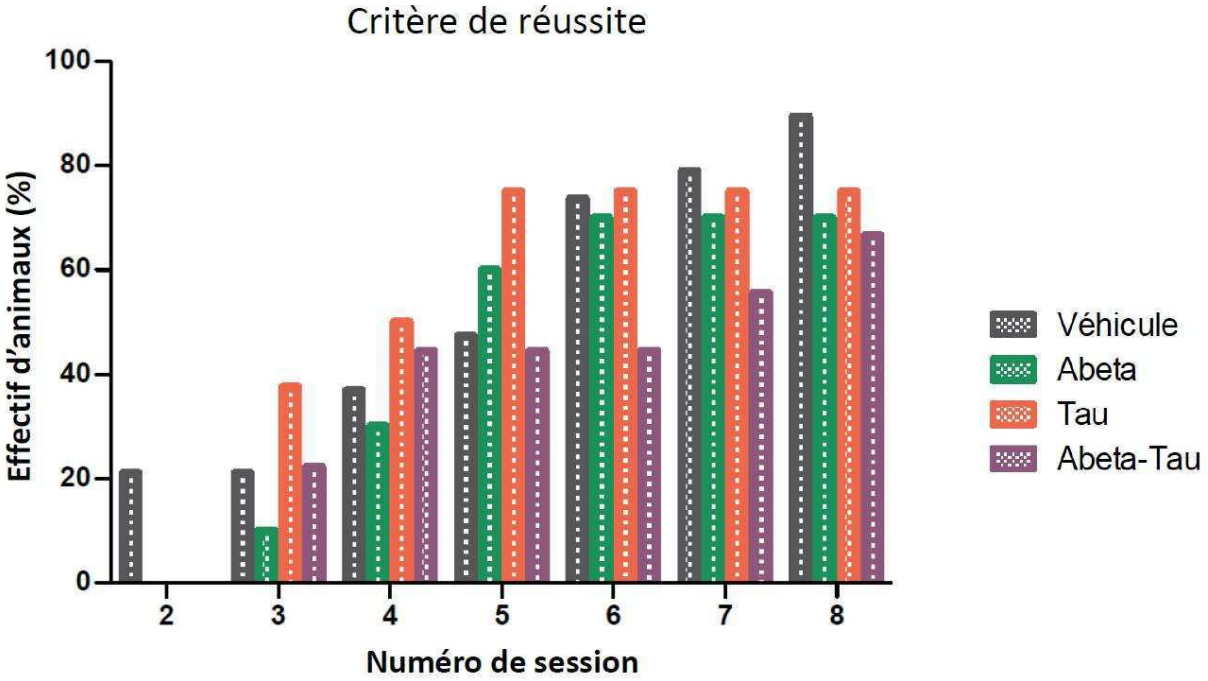
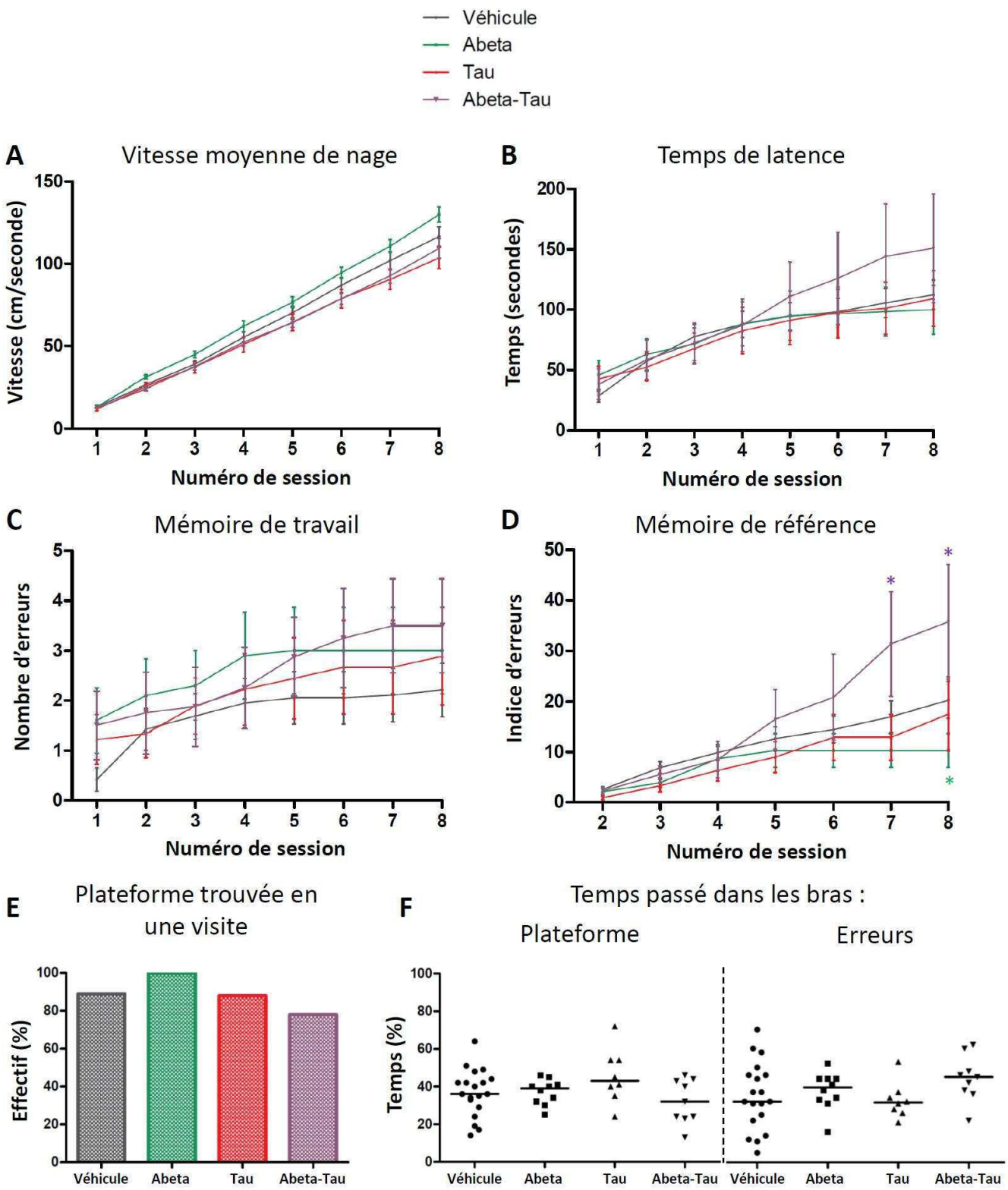


Figure 61 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après deux semaines post-injection.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.



<u>Figure 62</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à six semaines post-injection.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$).
E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme et les six bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.

Six semaines post-injection :

La vitesse moyenne de nage des rats du groupe Abeta est supérieure à celle des rats du groupe Véhicule, mais la différence n'est pas statistiquement signifcative (**figure 62 A**).

Au sujet des erreurs de type mémoire de travail (**figure 62 C**), la tendance à l'augmentation observée avec le groupe Abeta-Tau lors du précédent test, se confirme à six semaines post-injection. De plus, cet effet concerne, à ce stade, les trois différents traitements (Abeta, Tau et Abeta-Tau, non significatif).

Des effets sur la mémoire de référence ont également été constatés lors de la phase d'apprentissage : l'injection concomitante du peptide Aβ42 et du vecteur AAV-Tau a induit une augmentation significative (à partir de la session 7) de l'indice des erreurs de type mémoire de référence (**figure 62 D**), alors que l'injection seule du peptide Aβ42 a induit une baisse significative de cet indice (session 8). Dans ce dernier cas, la baisse de l'indice de mémoire de référence n'est pas associée à une amélioration des performances mnésiques des animaux, mais plutôt à un manque d'effet attendu sur la perturbation de la mémoire, d'autant plus que ces effets sur la mémoire de référence ne sont pas confirmés lors du test de rétention (**figure 62 E** et **F** et **figure 63**).

Aucun autre changement induit par les différents traitements n'a été observé sur les autres paramètres.

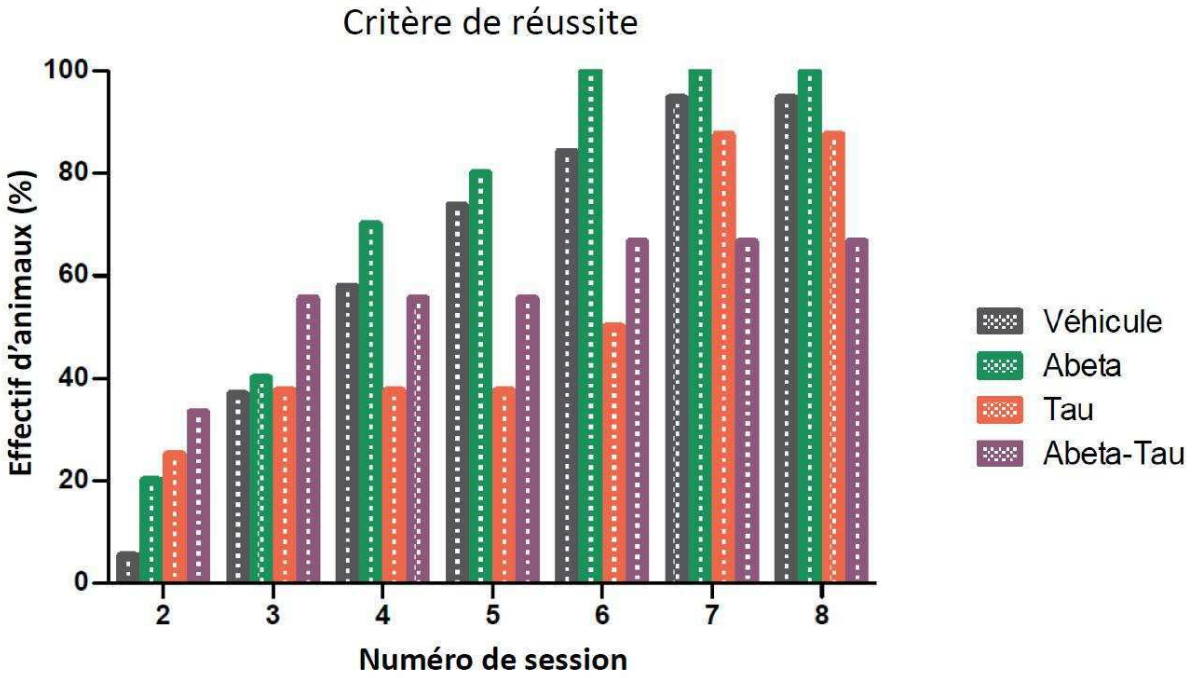
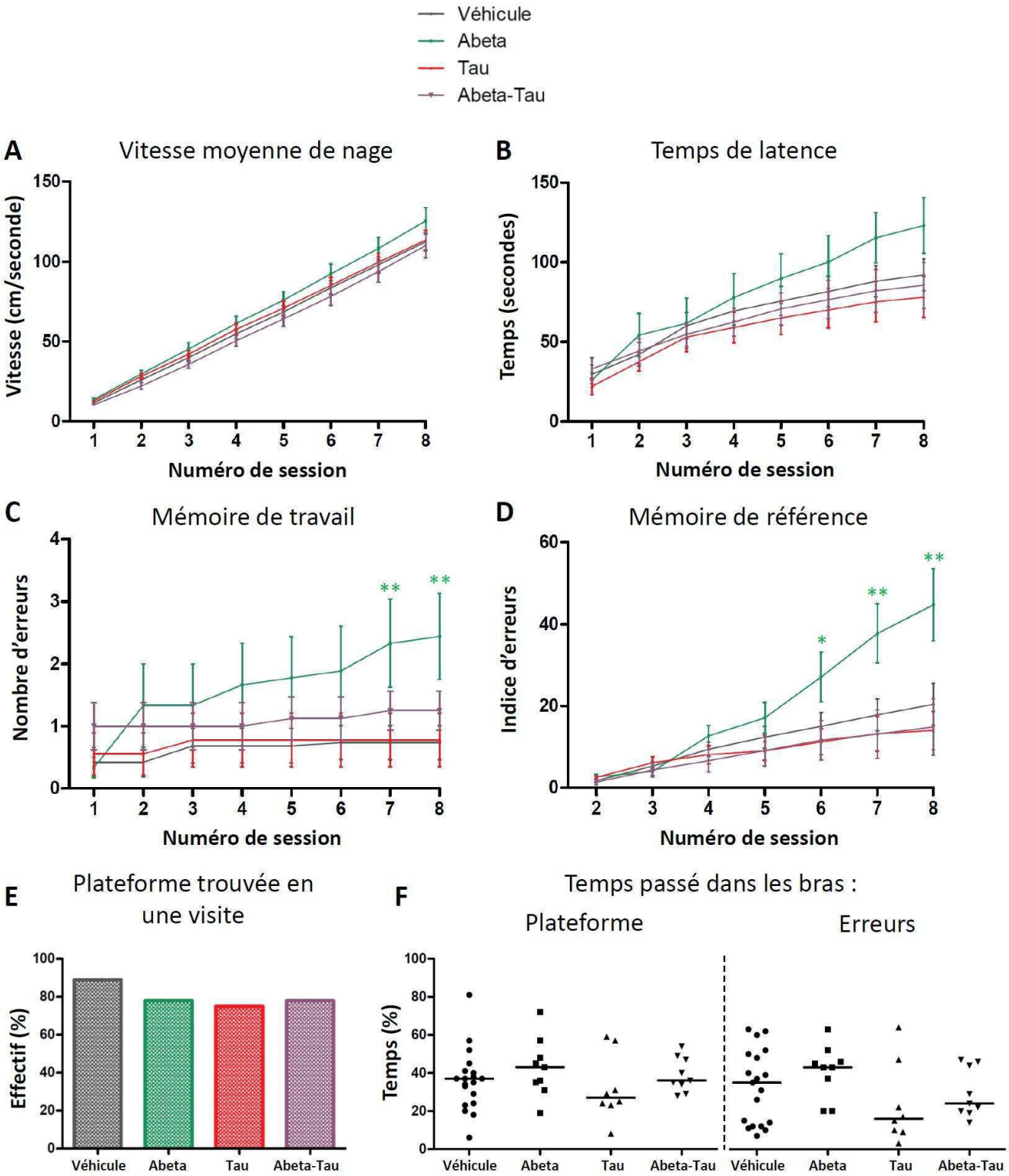


Figure 63 : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après six semaines post-injection.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats sortant positifs à ce critère de chaque groupe est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.



<u>Figure 64</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire à 12 semaines post-injection.

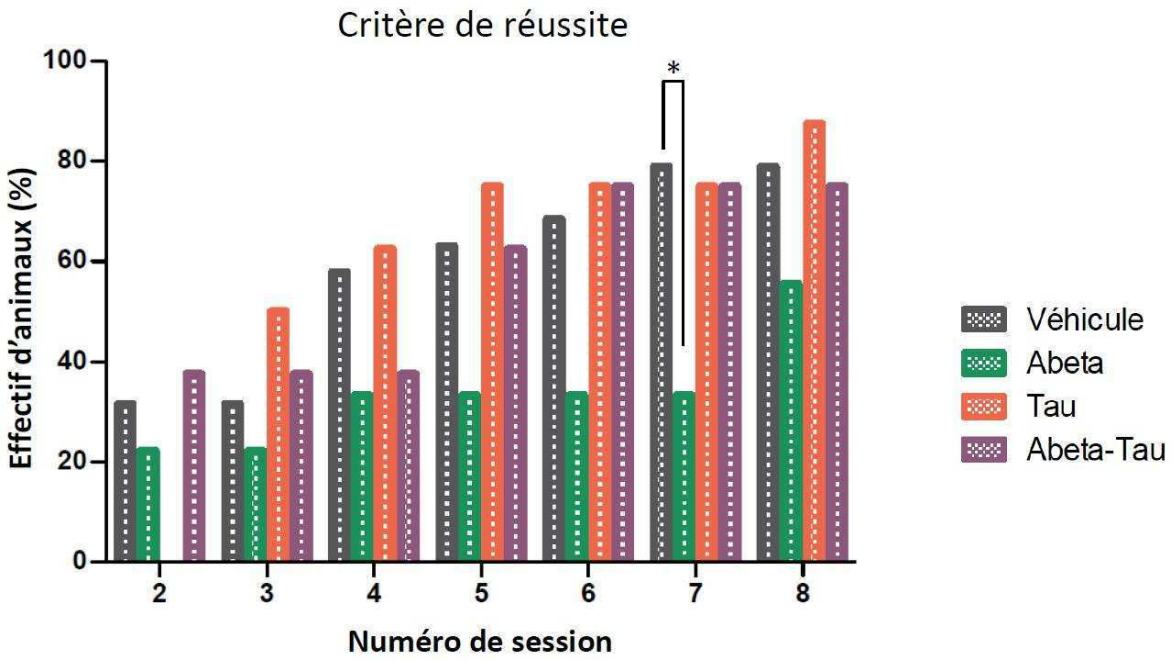
A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$).
E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme et les six bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.

Douze semaines post-injection :

Une tendance à l'augmentation de la vitesse de nage avec les rats du groupe Abeta est toujours observée après 12 semaines post-injection (**figure 64 A**). Malgré cette augmentation de la vitesse de nage, une tendance à l'augmentation du temps de latence (temps moyen pour trouver la plateforme) est également à noter avec le groupe Abeta par rapport au groupe Véhicule, ce qui laisse présager d'un effet mémoire (**figure 64 B**).

Cet effet potentiel sur une perturbation de la mémoire chez le groupe Abeta se confirme avec les autres paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. En effet, l'injection seule du peptide Aβ42 induit une augmentation significative des erreurs de type mémoire de travail (à partir de la session 7, **figure 64 C**) et de type mémoire de référence (à partir de la session 6, **figure 64 D**). L'effet sur la mémoire de référence se retrouve également sur le critère de réussite au test (**figure 65**), où une baisse significative de l'effectif des rats du groupe Abeta sortant positifs à ce critère, est observée (significatif à la session 7 mais pas à la session 8). Nous considérons que ce paramètre est le reflet d'une capacité d'apprentissage qui est uniquement basée sur les erreurs de type mémoire de référence car il correspond à des animaux qui trouvent la plateforme sans commettre ce type d'erreurs et lors de deux sessions consécutives. En revanche, l'effet sur la mémoire de référence constaté lors de la phase d'apprentissage n'est pas observé lors du test de rétention (**figure 64 E et F**). Nous avons également été surpris de ne pas observer un effet, au moins similaire, avec le groupe Abeta-Tau.

Aucun autre changement induit par les différents traitements n'est à noter.



<u>Figure 65</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage après 12 semaines post-injection.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. *: P≤ 0.05 par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=19 ; Groupe Abeta N=10 ; Groupe Tau N=8 ; Groupe Abeta-Tau N=9.

8.4. Discussion

Points positifs :

Les observations histologiques faites avec les dépôts de peptide Aβ, ont permis de valider le site d'injection située entre la couche CA1 et le gyrus denté. Ce site d'injection choisi semble convenir parfaitement au développement de notre modèle de la MA car il permet de cibler de manière spécifique l'hippocampe (aucune injection « manquée » constatée) et permet une diffusion du vecteur viral aux différentes couches neuronales de l'hippocampe qui a été observée par la présence des marquages de la protéine Tau phosphorylée.

Les lésions histologiques observées sont relativement proches, d'un point de vue morphologique, de certaines lésions retrouvées au niveau des cerveaux de patients atteints de MA : les dépôts diffus de peptide Aβ, les dépôts amyloïdes vasculaires, les inclusions de protéine Tau anormalement phosphorylée au sein des neurones pyramidaux des cornes d'Ammon (enchevêtrements neurofibrillaires en forme de flamme) ou au sein des neurones granulaires du gyrus denté, ainsi que la présence de fibres tortueuses correspondant aux neurites contenant des inclusions de protéine Tau phosphorylée (marquages de la protéine Tau sous la forme de points et de filaments). De plus, nous avons observé, pour la première fois, la présence de lésions de type neurofibrillaire à proximité de dépôts de peptide Aβ chez un rat non transgénique. Ce modèle de MA pourrait alors reproduire la synergie éventuelle entre le peptide Aβ et la protéine Tau (voir chapitre 1.3.3.2).

La composante inflammatoire semble également être présente dans ce modèle. Comme dans la MA, les différentes lésions histologiques observées sont associées à la présence d'astrocytes et de cellules microgliales réactives. Une perte neuronale semble également associée à la présence des différentes lésions avec les changements morphologiques (aspect « destructuré ») observées au niveau de la couche CA1 et de la couche dorsale du gyrus denté.

Points négatifs :

Au niveau histologique, nous n'avons pas observé de lésions présentant l'aspect morphologique des plaques séniles (dépôt focal sphérique de peptide Aβ entouré d'une couronne de neurites dystrophiques) malgré la proximité des deux types de lésions (dépôts de peptide Aβ et neurofibrilles de Tau) chez les rats ayant reçu l'injection concomitante du peptide Aβ42 et du vecteur AAV-Tau. Nous expliquons ceci par le fait que, dans notre modèle, la surcharge amyloïde est reproduite de façon aigüe, à la suite d'une injection de peptide Aβ1-42 sous forme pré-agrégée, ce qui est relativement éloigné de la pathologie. Dans la MA, la surcharge amyloïde se fait de manière progressive (sur plusieurs années) avec la sécrétion par les neurones de peptides Aβ de différentes tailles et sous forme monomérique, l'agrégation se produisant ensuite dans l'espace extracellulaire avec l'augmentation de la concentration en peptide Aβ (voir chapitre 1.3.1.1).

Un autre point négatif est que nous avons observé des marquages de la protéine Tau phosphorylée moins intenses et moins nombreux (par exemple : pas de marquage observé au niveau de la couche CA2) avec le groupe Abeta-Tau en comparaison avec le Groupe Tau. Cette observation est cependant à confirmer avec une autre série de rats, mais nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer cette observation :

- Une toxicité aigüe et un effet pro-inflammatoire induit par le peptide Aβ (décrit dans la littérature : voir chapitre 2.2.3, injection de peptide Aβ) ne constitue pas un environnement « idéal » pour la transfection de cellules par un vecteur viral, et pour l'expression d'une protéine.
- La solution de peptide Aβ injectée présente une certaine viscosité qui pourrait induire une rétention mécanique des particules virales, limitant ainsi leur diffusion à travers l'hippocampe.

Au sujet de l'évaluation de la mémoire, aucun effet significatif n'a été constaté avec l'injection du vecteur AAV-Tau seul, malgré le fait qu'une destruction de certaines couches de neurones de l'hippocampe soit observée en histologie. De plus, les effets observés avec les groupes Abeta et Abeta-Tau, sur une éventuelle perturbation de la mémoire, sont difficiles à commenter : ils ne sortent pas toujours de manière significative avec les tests statistiques, ils ne se reproduisent pas forcément d'un temps à l'autre et des effets observés sur la mémoire de référence lors des phases d'apprentissage ne sont généralement pas confirmés lors des tests de rétention. Nous avons également été surpris par les résultats obtenus lors du dernier test réalisé, où le traitement par le peptide Aβ semble avoir induit une altération de la mémoire (travail et référence) qui, à notre avis, aurait dû être retrouvée au moins avec la même intensité chez le groupe Abeta-Tau. De la même manière, l'effet locomoteur observé chez le groupe Abeta n'est pas retrouvé chez le groupe Abeta-Tau.

<u>Points d'améliorations à apporter lors des prochaines expériences</u> :

Le fait de répéter à plusieurs reprises le test de mémoire pourrait apporter un biais dans l'évaluation de la formation d'un apprentissage. En effet, le labyrinthe deviendrait de plus en plus « simple » à résoudre au fil des tests, ce qui pourrait conduire à une perte de sensibilité. Nous avons donc choisi, pour les prochaines expériences, de ne plus répéter les protocoles d'évaluation de la mémoire pour ne réaliser qu'un seul test, lors de la dernière semaine précédant les sacrifices.

Les éventuelles pertes neuronales et neuroinflammation observées en immunohistologie sont à confirmer avec une analyse biochimique lors de prochaines expériences.

9. Expérience n°2

9.1. Introduction

Une nouvelle expérimentation est réalisée dans le but de confirmer les résultats obtenus lors de l'expérience précédente et de tester l'hypothèse que le manque d'effet observé au niveau du test d'évaluation de la mémoire proviendrait de la répétition de ce tests avec les mêmes animaux. Pour cela, la même étude est réalisée, mais avec une durée post-injection avant les sacrifices réduit à neuf semaines, avec un test unique d'évaluation dans le RAWM réalisé à huit semaines post-injection. Ce temps plus court a été choisi par rapport aux résultats de l'expérience précédente où une tendance à l'augmentation des erreurs de mémoire de travail a été observée avec les trois groupes de rats « traités » (groupe Abeta, Tau et Abeta-Tau) et lors du temps post-injection intermédiaire. Dans le cas où ce type de résultat se confirmerait, nous pourrions réduire de un mois la durée de nos expérimentations.

Dans cette série, nous avons également choisi de réaliser l'immunohistologie sur un petit nombre de rats par groupe, afin seulement de valider la présence des lésions et afin de conserver du matériel biologique (cerveaux) pour d'éventuelles analyses biochimiques.

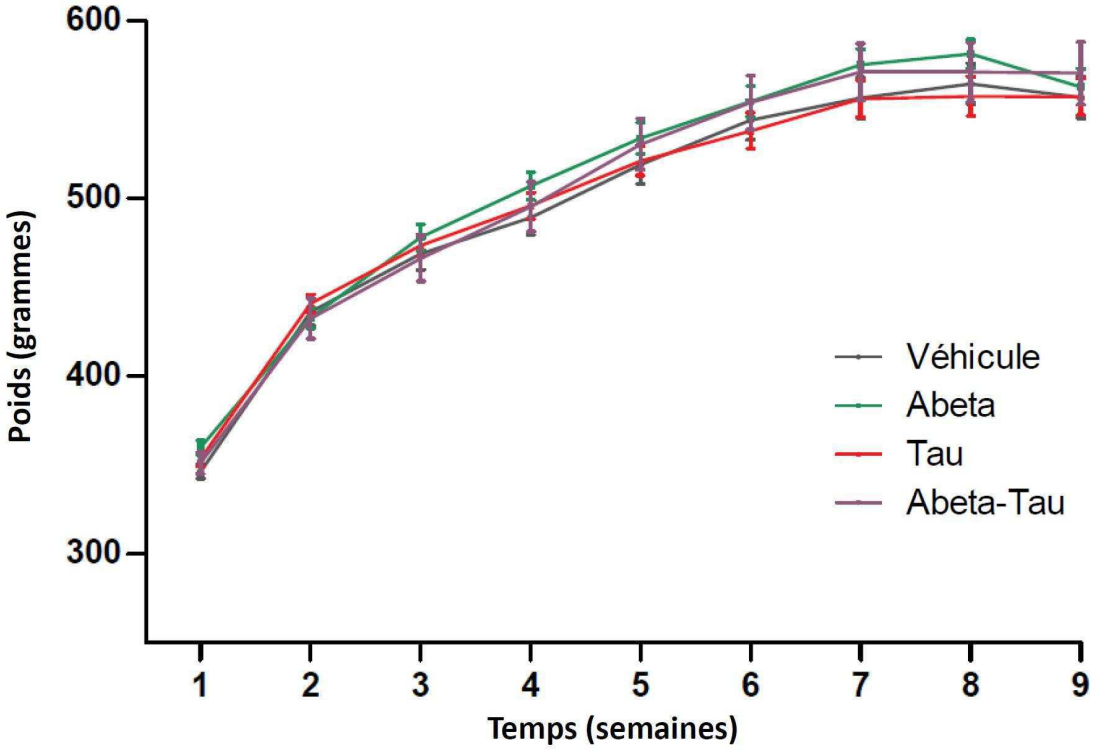
9.2. Matériels et méthodes

Procédure expérimentale :

Des rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) de 300g environ sont divisés en quatre groupes :

- **Groupe Véhicule :** 12 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale d'une solution composée de 20% d'H_2O_{UHQ} et de 80% de Ringer (Lactate Lavoisier, Paris, France).
- **Groupe Abeta :** 10 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 pré-agrégé (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Le petide Aβ est reconstitué et pré-agrégé 48 heures à 37°C, dans de l'H_2O_{UHQ} à la concentration de 2,5 nmol par microlitre. Avant l'injection, une solution de Ringer Lactate est ajoutée à la solution de peptide Aβ de manière à obtenir un ratio de 80% de Ringer Lactate et 20% d'H_2O_{UHQ}, avec une concentration finale de peptide Aβ de 0,5 nmol par microlitre.
- **Groupe Tau :** 12 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une suspension contenant $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L. Cette suspension est obtenue à partir de la dilution de celle fournie par le Pr. Klein (University of Shreveport, Louisiane, USA) : suspension de $2,1 .10^{10}$ particules diluée dans la solution de Ringer lactate à $5,25 .10^8$ particules.
- **Groupe Abeta-Tau :** 12 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant un mélange de 2 nmol de peptide Aβ 1-42 pré-agrégé et $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L.

Les injections ont été réalisées suivant deux lots de cinq ou six animaux pour chaque groupe. Les résultats d'évaluation de la mémoire, obtenus pour les différents lots, sont ensuites rassemblés. Le déséquilibre observé entre les effectifs des différents groupes s'explique par la perte de quelques animaux lors des injections intracérébrales.



<u>Figure 66</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°2.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Groupe Véhicule : N=12 ; Groupe Abeta : N=10 ; Groupe Tau : N=12 ; Groupe Abeta-Tau N=12.

L'évaluation de la mémoire se fait selon le second protocole de RAWM (version « simplifiée ») qui est effectué à huit semaines post-injection. Les animaux sont sacrifiés lors de la neuvième semaine post-injection afin de prélever leur cerveau pour les analyses histologiques et biochimiques. Un tiers des cerveaux prélevés chez chacun des groupes sont paraffinés pour la réalisation de l'immunohistologie. Les autres cerveaux sont cryo-conservés pour d'éventuelles analyses biochimiques.

La préparation des différentes substances injectées, ainsi que la technique d'immunhistologie sont réalisées suivant les mêmes procédures que celles utilisées lors de l'étude préliminaire. La liste des anticorps utilisés pour l'immunohistologie est présentée dans le tableau suivant :

Anticorps	Clone ou fluorochrome	Classe	Espèce hôte	Cible	Dilution	Fournisseur
Primaires	/ (anti-Tau P S422)	Polyclonal	Lapin	Phosphate sur Ser 422 (anti-PHF)	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	PHF1	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 396 et 404 de Tau	1/100	Dr. Peter Davies, Hofstra North Shore-LIJ School of Medicine, NY , USA
	WO2	Monoclonal	Souris	AA 4-10 du peptide humain Aβ	1/100	Merck Millipore, Molsheim, France
Secondaires	Alexa-488	Polyclonal	Ane	Ig de souris	1/50	Jackson Immuno Research, Villepinte, France
	RRX			Ig de souris		
	Alexa-488			Ig de lapin		

<u>Tableau 10</u> : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°2.

Ser : sérine

9.3. Résultats

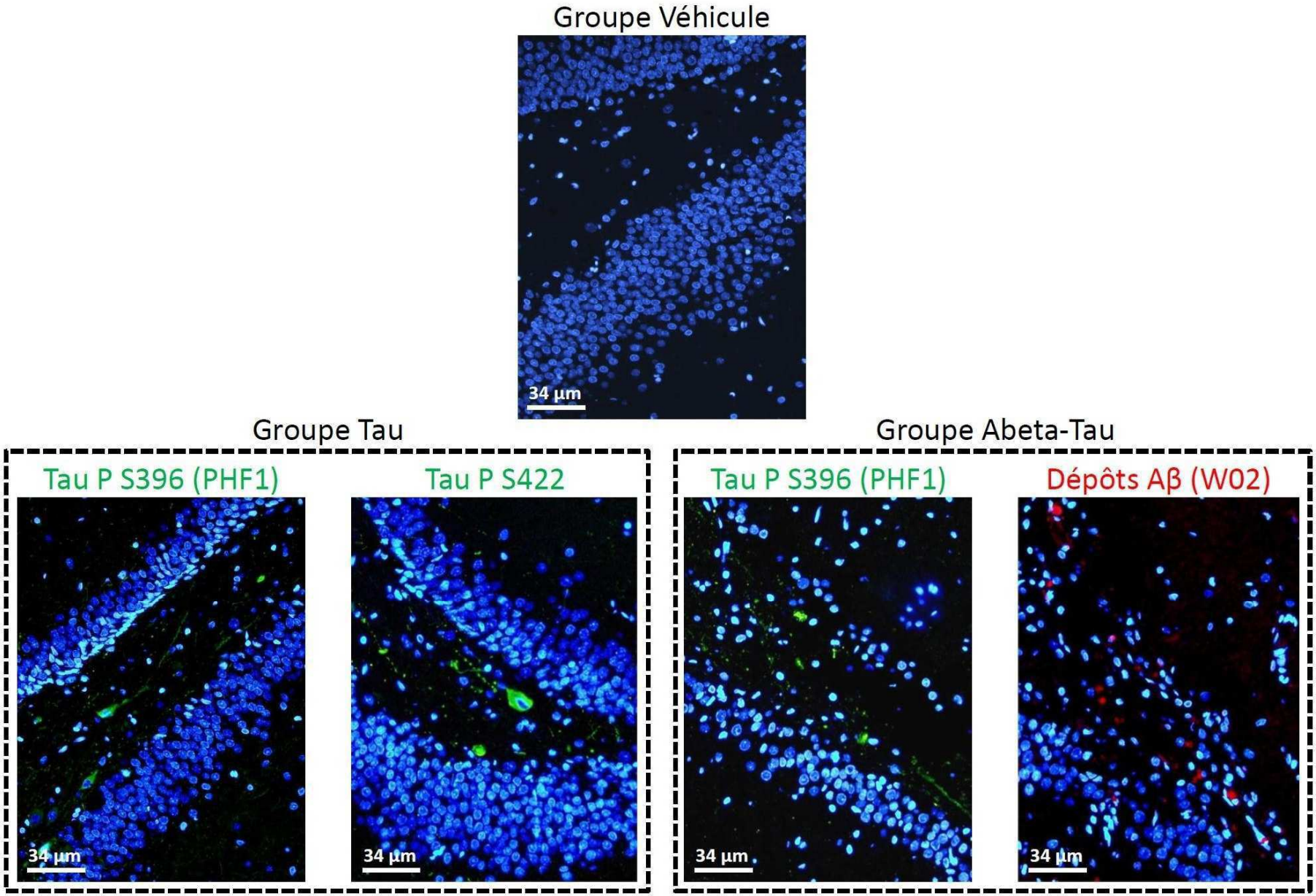
9.3.1. Suivi du poids

Les différents traitements (Abeta, Tau ou Abeta-Tau) administrés aux rats, n'induisent aucun changement au niveau de la prise de poids des animaux, en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 66**).

9.3.2. Observation histologique des différentes lésions

<u>Lésions de type neurofibrillaires</u> :

Globalement, nous avons observé moins de marquage de la protéine Tau phosphorylée avec cette durée post-injection de neuf semaines, que dans l'expérience précédente (durée post-injection de 13 semaines). Par exemple, nous n'avons pas observé d'inclusions de Tau phosphorylée au niveau de la couche CA2 avec le groupe Tau et au niveau de la couche CA1 et CA2 avec le groupe Abeta-Tau



<u>Figure 67</u> : Marquage de la protéine Tau phosphorylée et du peptide Aβ au niveau du gyrus denté.

La protéine Tau phosphorylée est marquée par l'anticorps PHF1 (en vert, groupe Tau et Abeta-Tau) et l'anticorps anti-Tau P S422 (en vert, groupe Abeta-Tau). Les dépôts de peptide Aβ sont marqués par l'anticorps WO2 (en rouge, groupe Abeta-Tau).

(**figure 68**). Encore une fois, le marquage de la protéine Tau semble moins important avec le groupe Abeta-Tau en comparaison avec les rats ayant reçu le vecteur AAV-Tau seul et nous avons obtenu un marquage de la protéine Tau anormalement phosphorylée (anticorps anti-Tau P S422) seulement avec le groupe Tau et limité au gyrus denté (**figure 67**).

Lésions de type dépôt amyloïde :

Des dépôts de peptide Aβ ont été observés seulement chez le groupe Abeta-Tau, au niveau du site d'injection et de la couche dorsale du gyrus denté (**figure 67**) ainsi qu'autour de vaisseaux cérébraux (**figure 68**). Le fait que ces dépôts n'ont pas été observés chez le groupe Abeta démontre que la substance injectée reste à proximité du point d'injection, et qu'il faut donc réaliser des coupes de cerveau dans l'axe du passage de l'aiguille d'injection pour pouvoir les visualiser.

Autres observations :

Des marquages de la protéine GFAP et Iba1 ont également été réalisés (non présentés) mais nous n'avons pas constaté de changement particulier entre les trois groupes « traités » (Abeta, Tau et Abeta-Tau) et le groupe Véhicule.

Du point de vue de l'aspect morphologique des couches neuronales de l'hippocampe, seule une atteinte de la couche dorsale du gyrus denté a été observée chez des rats du groupe Abeta-Tau (**figure 67**). Contrairement à l'expérience précédente, aucun changement morphologique n'est constaté au niveau de la couche CA1 (**figure 68**).

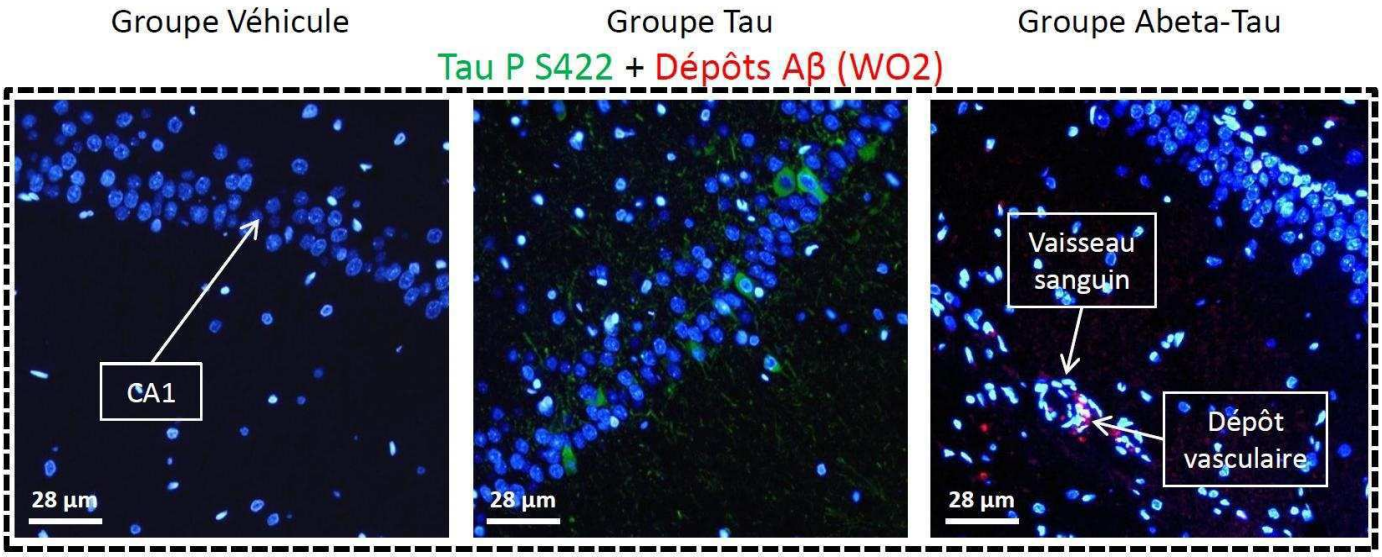
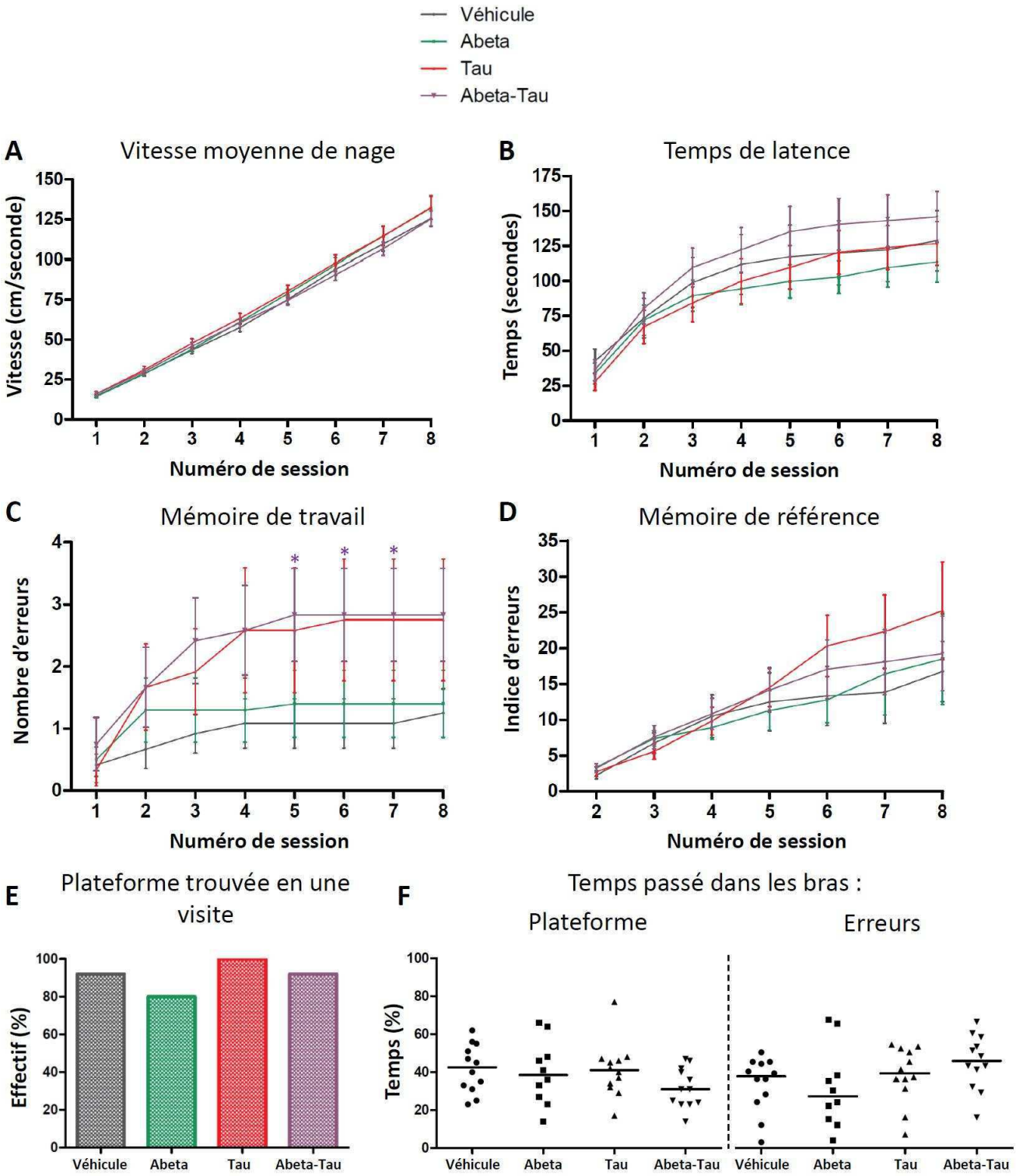


Figure 68 : Co-marquage du peptide Aβ et de la protéine Tau phosphorylée.

Les images présentées ont été réalisées au niveau de la couche CA1. La protéine Tau anormalement phosphorylée est marquée avec l'anticorps anti-Tau P S422 (en vert) et les dépôts de peptide Aβ sont marqués par l'anticorps WO2 (en rouge). Des dépôts vasculaires ont également été observés chez des rats du groupe Abeta-Tau.



<u>Figure 69</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à une position de plateforme.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).

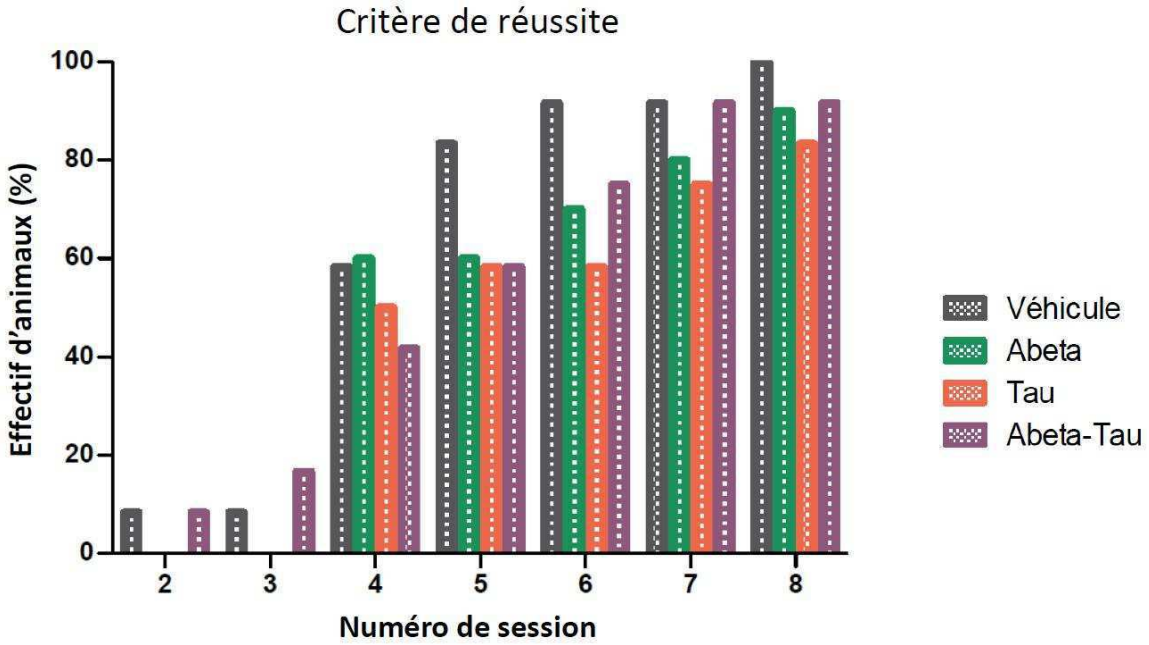
E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position de la plateforme sans commettre d'erreur et **F**, le temps passé pour chaque rat dans le bras plateforme et les six bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=12 ; Groupe Abeta : N=10 ; Groupe Tau : N=12 ; Groupe Abeta-Tau N=12.

9.3.3. Evaluation de la mémoire

L'injection concomitante de peptide Aβ42 et du vecteur AAV-Tau a induit une augmentation du nombre d'erreurs de mémoire de travail en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 69 C**). L'écart du nombre des réentrées observé entre ces deux groupes se fait essentiellement lors des premières sessions. Cet écart est significatif de la session 5 à la session 7. Cet effet sur la mémoire de travail est également constaté avec le groupe Tau, mais de manière non significative du fait d'une plus grande hétérogénéité des valeurs obtenues avec ce groupe. En effet, plusieurs animaux du groupe Tau se sont comportés comme des rats du groupe témoin (Véhicule) alors que d'autres semblaient présenter une perturbation de la mémoire de travail. Nous avons fait la même constatation chez les rats du groupe Abeta-Tau, mais la part des animaux ne présentant aucun « signe » de trouble de la mémoire en comparaison avec le groupe témoin, est moins importante chez ce groupe. Aucun effet sur ce paramétre n'a été observé suite à l'injection seule du peptide Aβ.

Une tendance à l'augmentation (non significative) de l'indice des erreurs de type mémoire de référence est observée avec le groupe Tau (**figure 69 D**) en comparaison avec le groupe Véhicule. Mais encore une fois, une forte hétérogénéité est constatée sur ce paramètre avec ce groupe et cet éventuel effet sur la mémoire de référence n'est pas confirmé par le test de rétention (**figure 69 E et** F). Aucun changement sur ce paramètre n'est constaté avec les deux autres groupes « traités » (Abeta et Abeta-Tau) en comparaison avec le groupe Véhicule.

Aucun autre changement induit par les différents traitements n'a été observé sur les autres paramètres.



<u>Figure 70</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve la plateforme sans commettre d'erreurs de mémoire de référence lors de deux sessions consécutives. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. Groupe Véhicule : N=12 ; Groupe Abeta : N=10 ; Groupe Tau : N=12 ; Groupe Abeta-Tau N=12.

9.4. Discussion

Points positifs :

Cette expérience a permis de confirmer la présence des lésions histologiques de type dépôts de peptide Aβ et inclusions de protéine Tau phosphorylées au sein de l'hippocampe, après une injection intra-hippocampique de peptide Aβ42 pré-agrégé et du vecteur AAV-Tau P301L chez le rat. Les mêmes aspects morphologiques des différentes lésions observées lors de l'expérience précédente, sont également retrouvés dans cette série :

- Dépôts diffus de peptide Aβ.
- Dépôts vasculaires de peptide Aβ.
- Inclusions de protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée.
- Présence de fibres tortueuses.

De plus, la tendance à l'augmentation des erreurs de type mémoire de travail, observée au temps intermédiaire lors de l'expérience précédente, a été confirmée avec un effet significatif obtenu avec le groupe Abeta-Tau et une tendance à l'augmentation avec le groupe Tau. A l'inverse, aucun effet évident n'est constaté sur la mémoire de référence. Les perturbations de la mémoire obtenues semblent donc provenir essentiellement des lésions de type neurofibrillaire (aucun effet constaté avec le peptide Aβ seul) et toucher plus spécifiquement la mémoire de travail. Une perturbation plus marquée de la mémoire de travail que de la mémoire de référence après une injection intracérébrale de vecteur AAV-Tau, a déjà été décrite dans certains travaux réalisés par l'équipe du Pr. Klein. Par exemple, dans les articles de Ramirez et Mustroph, l'injection de ce vecteur induit une altération de la mémoire de travail dans un test d'alternance spontanée (Ramirez et al., 2011)(Mustroph et al., 2012) alors qu'aucun effet significatif n'a été noté sur la mémoire de référence (seulement une tendance à une altération) avec un test de Morris water maze (Dayton et al., 2012b). De plus, une atteinte de la mémoire de travail est cohérente avec une légère atteinte de l'hippocampe et les premiers signes cliniques observés dans la MA (voir chapitre 3.1.3.2).

Points négatifs :

Le fait que nous ayons obtenu peu de marquage de la protéine Tau, des astrocytes et des cellules microgliales, ainsi que peu de changement de l'aspect morphologique des couches neuronales de l'hippocampe en comparaison avec l'expérience n°1, nous a permis de revenir sur notre décision de réduire la durée post-injection. Il est nécessaire de laisser une durée suffisamment longue après l'injection du vecteur AAV-Tau afin que la protéine Tau soit exprimée à un niveau suffisant pour pouvoir former des agrégats, et qu'elle puisse être hyperphosphorylée et phosphorylée sur des sites considérés comme pathologiques. De plus, nous n'avons pas obtenu d'effet sur la mémoire avec l'injection seule de peptide Aβ, or un effet avait été observé avec le peptide seulement après 12 semaines post-injection lors de l'expérience précédente. Ce dernier point est néanmoins surprenant car l'injection de peptide Aβ sous cette forme (42 AA et pré-agrégé) au niveau de l'hippocampe est bien décrite dans la littérature et est connue pour produire une altération rapide et importante de la mémoire (quelques jours à quelques semaines après son injection, voir chapitre 2.2.3). Cependant, un manque d'effet sur la mémoire du peptide Aβ42 a déjà été décrit par Winkler (Winkler et al., 1994) dans un MWM et même après de longue période post-injection (15 mois). L'auteur décrit les dépôts de peptide Aβ chez le rat comme une substance inerte, non éliminée avec le temps,

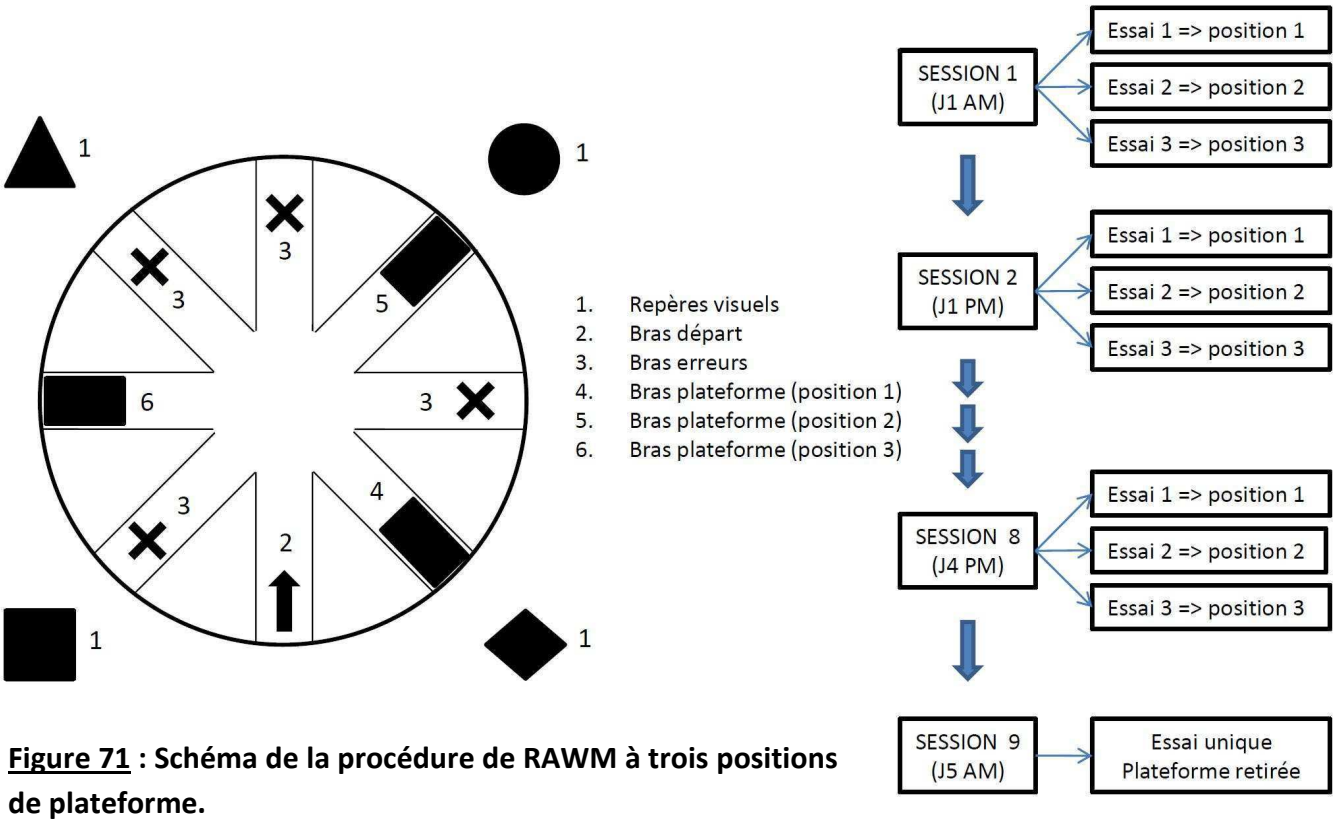
et ne produisant pas d'effets particuliers. L'auteur propose également une revue bibliographique de travaux réalisés sur le peptide Aβ et conduisant aux mêmes conclusions.

Au vu de ces « moins bons » résultats obtenus au niveau des lésions histologiques, nous avons pris la décision de ne pas réaliser d'analyses biochimiques sur cette série de rats. Ces analyses seront conduites lors d'une prochaine expérience où une durée post-injection plus longue aura été appliquée.

Points d'améliorations à apporter lors des prochaines expériences :

Au regard des différents points soulevés lors de ces deux dernières expériences, nous avons identifié plusieurs améliorations à apporter lors de nos prochaines expérimentations :

- Augmenter la durée post-injection à 12 semaines pour réaliser le test d'évaluation de la mémoire.
- Développer un test de mémoire plus sensible à une altération de la mémoire de travail. En effet, dans cette dernière expérience, l'écart du nombre d'erreurs observé se fait essentiellement lors des premières sessions (pas d'effet significatif à la session 8).
- Changer la forme du peptide Aβ injecté. Une forme soluble (non pré-agrégé) pourrait donner de meilleurs résultats. Dans la littérature, il y a de plus en plus d'éléments qui tendent à démontrer que le peptide Aβ est plus toxique sous des formes solubles (voir chapitre 1.3.1.1). Nous pensons également que le peptide Aβ pourrait diffuser plus facilement au sein de l'hippocampe, sous forme soluble et qu'il pourrait s'agréger directement *in vivo*, donc dans des conditions plus proche de la MA.
- Les co-injections de vecteur AAV-Tau et de peptide Aβ42 se feront désormais de manière séparée (pas de mélange dans une même seringue) afin d'éviter d'éventuelles interactions mécaniques liées à la viscosité de la solution de peptide Aβ.



<u>Figure 71</u> : Schéma de la procédure de RAWM à trois positions de plateforme.

10. Amélioration du test du RAWM à l'aide d'une substance de référence

Afin d'améliorer la sensibilité de notre procédure d'évaluation de la mémoire précédemment mise au point à l'aide de la scopolamine (substance amnésiante), une nouvelle procédure utilisant le même dispositif de RAWM est développée. Ce nouveau protocole provient de la combinaison du protocole standard d'évaluation de la mémoire de référence avec le protocole standard d'évaluation de la mémoire de travail, utilisé dans des tests de navigation spatiale comme le MWM et le RAWM (voir chapitre 3.2). En effet, nous avons choisi de faire varier la position du bras plateforme en maintenant fixe la position du bras de départ (inspiré du protocole d'évaluation de la mémoire de travail), mais également de maintenir des bras qui ne présenteront jamais la plateforme et dont leur position est fixée pour l'ensemble des sessions (inspiré du protocole d'évaluation de la mémoire de référence). De plus, un test de rétention est également réalisé à la fin d'une phase d'apprentissage.

Pour valider cette nouvelle procédure, nous avons également utilisé la scopolamine comme substance de référence mais à des doses plus faibles. L'objectif étant de valider un test plus sensible que les précédents.

Animaux et substances administrées :

Les animaux utilisés sont des rats males Sprague Dawley d'environ 250g provenant de l'éleveur Janvier (Le Genest Saint-Isle, France). Les animaux sont divisés en trois groupes :

- Groupe Véhicule (N=12) : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de NaCl 0,9%.
- Groupe Scopolamine 0,2 (N=8) : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de scopolamine à la concentration de 0,2 mg/mL.
- Groupe Scopolamine 0,5 (N=8) : injection intrapéritonéale de 1 mL/kg d'une solution de scopolamine à la concentration de 0,5 mg/mL.

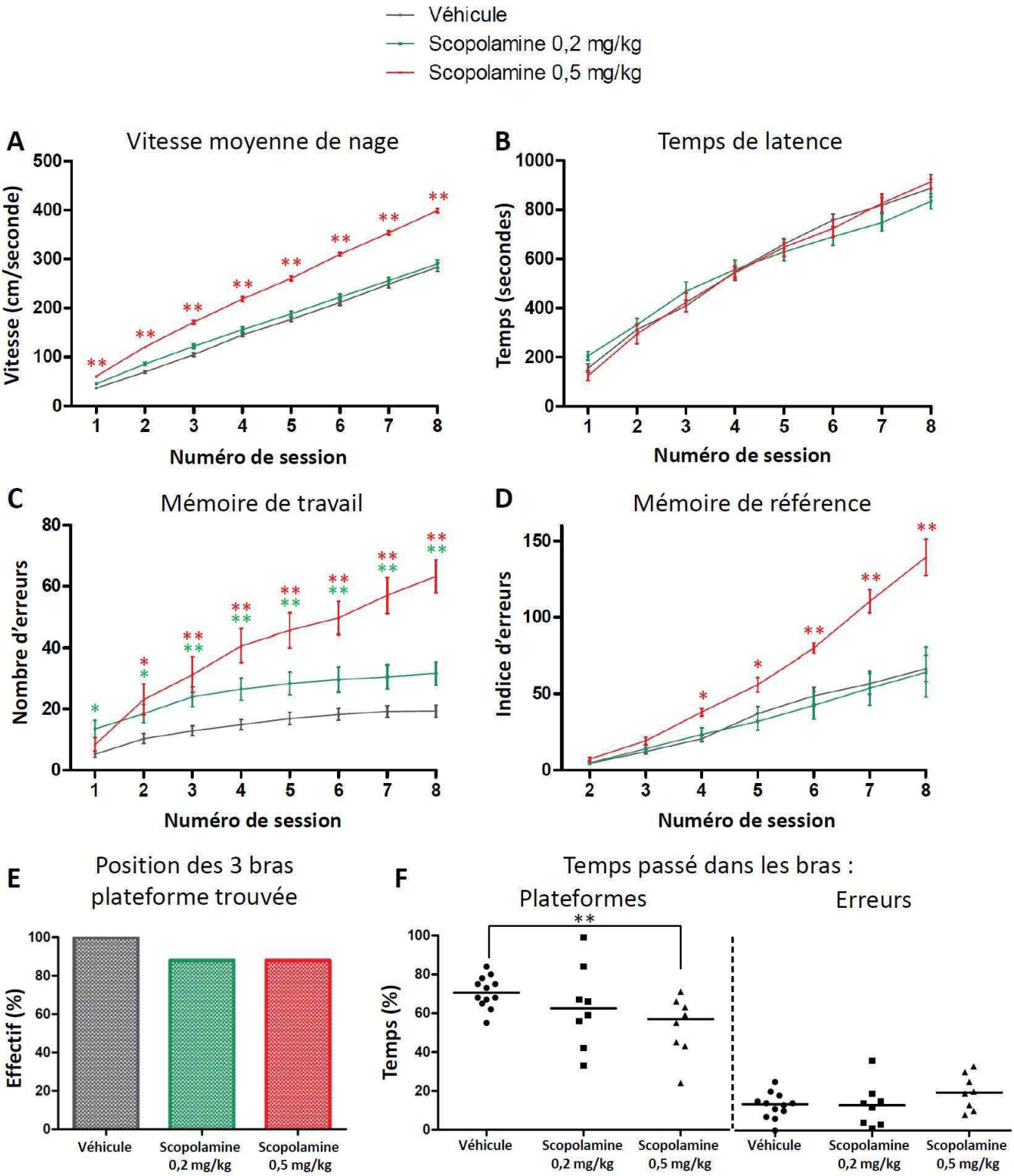
La scopolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) est reconstituée dans une solution de NaCl 0,9% (Cooper, Melun, France) avant d'être injectée par voie intrapéritonéale. Toutes les injections sont réalisées 15 minutes avant chaque passage dans le RAWM (test de rétention compris). Le passage des rats dans le RAWM se fait suivant un ordre aléatoire établit par avance.

Détail de la nouvelle procédure :

La procédure de passage des animaux dans le RAWM se divise en deux étapes :

- Phase d'apprentissage : deux sessions par jour et par rat espacées de cinq heures (une le matin et une l'après-midi), pendant quatre jours. Chaque session se divise en trois essais consécutifs. La plateforme est placée dans l'un des trois bras « plateforme » avant chaque essai et suivant un ordre prédéfini : essai n°1, position 1 ; essai n°2, position 2 et essai n°3, position 3 (**figure 71**).
  Déroulement d'une session :

  - La plateforme est placée dans le bras plateforme en position 1.
  - Le rat est placé dans le bras de départ, 15 minutes après l'injection intrapéritonéale.



<u>Figure 72</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire utilisant le protocole à trois positions de plateforme.

A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).

E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position des trois plateformes, **F**, le temps passé pour chaque rat dans les bras plateformes et les quatre bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=12 ; Groupes Scopolamine N=8.

- Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes maximum. Si au bout des 90 secondes, la plateforme n'a pas été trouvée, le rat est conduit jusqu'à elle.
- Le rat doit rester 30 secondes minimum sur la plateforme à chaque essai. S'il saute de la plateforme avant la fin des 30 secondes, il est immédiatement reconduit jusqu'à elle.
- A la fin du premier essai, le rat est retiré du dispositif, puis la plateforme est positionnée en position 2. Le rat est alors immédiatement placé dans le bras de départ pour l'essai n°2. La même démarche est réalisée pour le troisième essai en plaçant la plateforme en position 3.
- A la fin d'une session, le rat est séché puis déposé dans sa cage.

- Test de rétention : un seul passage par rat réalisé 24 heures après la dernière session de la phase d'apprentissage.

  - Le rat est placé dans le bras départ du RAWM.
  - Le rat est laissé libre de nager pendant 90 secondes.
  - A la fin du test, le rat est séché puis déposé dans sa cage.

Analyse des résultats :

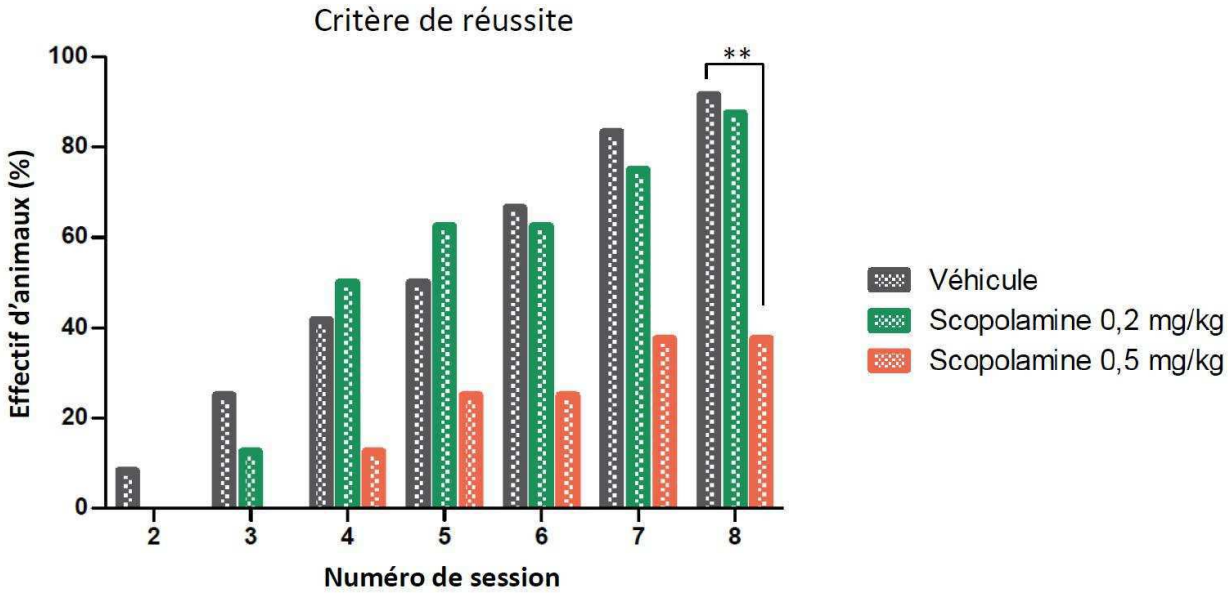
La même méthode d'analyse que pour les tests de RAWM précédents est appliquée, excepté que les résultats obtenus dans les trois essais d'une session sont additionnés entre eux. Le critère de réussite au test est ici défini par le fait qu'un rat trouve les trois plateformes, lors d'une session d'apprentissage, en commettant au maximum qu'une seule erreur de type mémoire de référence lors de ces trois sessions. Pour le test de rétention, le paramètre correspondant aux rats trouvant la plateforme en une visite est remplacé par l'effectif des rats de chaque groupe trouvant les trois positions de plateforme.

Résultats obtenus :

Comme déjà constaté lors des mises au point précédentes, la scopolamine induit une augmentation de la vitesse moyenne de nage (à la dose de 0,5 mg/kg), ce qui rend impossible l'interprétation du paramètre du temps de latence (**figure 72 A**).

Au niveau du nombre des réentrées effectuées, la scopolamine induit une augmentation des erreurs de type mémoire de travail (**figure 72 C**). L'écart du nombre d'erreurs commis observé entre le groupe Véhicule et les deux groupes scopolamine est significatif dès la première session avec la dose de 0,2 mg/kg et à partir de la session 2 avec la dose de 0,5 mg/kg. L'augmentation du nombre des erreurs de type mémoire de travail est essentiellement observée lors de la première session avec la scopolamine à la dose de 0,2 mg/kg, contrairement à la dose de 0,5 mg/kg où elle concerne l'ensemble des sessions.

La scopolamine à la dose de 0,5 mg/kg a également induit une augmentation de l'indice des erreurs de type mémoire de référence (**figure 72 D**), de manière significative en comparaison avec les rats du groupe Véhicule (écart significatif à partir de la session 4). Cet effet sur la mémoire de référence est confirmé par le test de rétention où une baisse du temps passé dans les trois bras plateformes est constatée par rapport au groupe Véhicule (effet significatif, **figure 72 F**).



<u>Figure 73</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve, lors d'une session, les trois plateformes en comettant un maximum d'une erreur de mémoire de référence. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. *: P≤ 0.05 ; **: P≤ 0.01 par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule N=12 ; Groupe Scopolamine N=8.

Le paramètre du critère de réussite au test, basé sur la mémoire de référence, confirme également l'effet observé sur la mémoire de référence. En effet, très peu de rats du groupe scopolamine 0,5 mg/kg sortent positifs à ce critère. L'écart observé entre l'effectif de rats du groupe Véhicule et l'effectif de rat du groupe scopolamine 0,5 mg/kg augmente à chaque nouvelle session et devient significatif à la session 8 (**figure 73**). Nous interprétons ce résultat comme une diminution de la capacité d'apprentissage chez les rats du groupe scopolamine 0,5. La scopolamine à la dose de 0,2 mg/kg n'a pas induit de changement sur l'ensemble des paramètres concernant la mémoire de référence.

Conclusion :

Le nouveau protocole développé a permis de distinguer une dose de scopolamine agissant spécifique ment sur la mémoire de travail, sans altérer la mémoire de référence (dose de 0,2 mg/kg). Cet effet a été décrit dans la littérature avec un RAM (Kay et al., 2010) où l'auteur identifie également deux doses : une dose faible altérant spécifiquement la mémoire de travail et une dose forte altérant les deux types de mémoire. Cette nouvelle procédure d'évaluation de la mémoire semble également plus sensible que les précédentes car il a fallut moins de sessions d'apprentissage pour détecter des effets significatifs sur la mémoire avec la scopolamine à la dose de 0,5 mg/kg.

Nous avons donc choisi d'utiliser cette procédure d'évaluation de la mémoire pour les prochaines expérimentations concernant le développement du modèle de MA.

11. Expérience n°3

11.1. Introduction

Afin de répondre aux différents points d'amélioration soulevés lors de l'expérience n°2, une nouvelle étude visant à développer un modèle de la MA chez le rat est conduite. Cette nouvelle expérience est basée sur le même type de plan expérimental que les deux précédentes, à savoir, des rats divisés en quatre groupes afin de comparer l'effet des trois traitements Abeta, Tau et Abeta-Tau, à un groupe témoin (le groupe Véhicule). Une évaluation de la mémoire est réalisée à 12 semaines post-injection à l'aide de la procédure à trois positions de plateforme utilisée dans le RAWM. Un plus grand nombre d'animaux a été choisi dans cette étude afin de renforcer la pertinence des analyses statistiques effectuées sur les résultats de l'évaluation de la mémoire. Une observation des lésions histologiques est réalisée à la suite de l'évaluation de la mémoire (13 semaines post-injection).

Cette nouvelle étude diffère des deux précédentes par le fait que le peptide Aβ injecté est désormais sous forme soluble (sans étape d'agrégation) et par une modification du protocole d'injection stéréotaxique afin d'éviter de mélanger les différentes substances (solution de peptide Aβ et suspension d'AAV). De plus, une évaluation de certains paramètres biochimiques a été conduite à l'aide de la technique de western-blot afin de valider une éventuelle perte neuronale ainsi que la neuroinflammation observée en histologie.

11.2. Matériels et méthodes

Modification de la procédure d'injection stéréotaxique :

La co-injection du peptide Aβ et du vecteur AAV ne se fait plus sous la forme d'un mélange de 4 µL mais avec deux injections distinctes de 4 µL chacune. Le vecteur AAV-Tau est toujours injecté en premier et de manière bilatérale, afin de laisser une durée d'environ 15 minutes avant d'injecter le peptide Aβ. Pour les groupes traités avec, soit le peptide Aβ seul, soit le vecteur AAV seul, une injection de 4 µL de véhicule est pratiquée en plus de la substance injectée, afin de mimer la double injection intrahippcampale du groupe Abeta-Tau.

Afin de positionner l'aiguille de la seconde injection à la même profondeur (P) que celle de la première injection, la technique suivante est utilisée :

- La coordonnée **P01** du point bregma obtenue avec le premier système d'injection (aiguille et seringue Hamilton contenant la première substance à injecter) est relevée.
- L'aiguille Hamilton est positionnée aux coordonnées d'injection suivantes : AP - 4 mm et L ± 2,6 mm (coordonnées inchangées).
- La coordonnée **P** correspondant à la surface du crâne au niveau du point d'injection est relevée. Le crâne est ensuite percé, puis l'injection se fait à la coordonnée P - 4,5 mm.
- Pour l'injection suivante, la coordonnée P de la surface du crâne au niveau du site d'injection ne pouvant plus être relevée, la coordonnée **P02** du point bregma est relevée avec le deuxième système d'injection.
- L'aiguille Hamilton du deuxième système est positionnée aux coordonnées correspondant au site d'injection (AP - 4 mm et L ± 2,6 mm).
- L'aiguille est alors descendue à la coordonnée calculée de la manière suivante :

$$(P - 4{,}5) + (P02 - P01)$$

Anticorps	Clone ou fluorochrome	Classe	Espèce hôte	Cible	Dilution	Fournisseur
Primaires	/ (anti-Tau P S422)	Polyclonal	Lapin	Phosphate sur Ser 422 (anti-PHF)	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	PHF1	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 396 et 404 de Tau	1/100	Dr. Peter Davies, Hofstra North Shore-LIJ School of Medicine, NY , USA
	WO2	Monoclonal	Souris	AA 4-10 du peptide humain Aβ	1/100	Merck Millipore, Molsheim, France
	/ (anti-GFAP)	Polyclonal	Lapin	Protéine GFAP des astrocytes	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	/ (anti-Iba1)	Polyclonal	Chèvre	AA 135-147 de la protéine humaine Iba1 des macrophages	1/100	Abcam Cambridge, Royaume-Uni
Secondaires	Alexa-488	Polyclonal	Ane	Ig de souris	1/50	Jackson Immuno Research, Villepinte, France
	RRX			Ig de souris		
	RRX			Ig de lapin		
	RRX			Ig de chèvre		

<u>Tableau 11</u> : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°3.

Ser : sérine.

Procédure expérimentale :

Des rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) de 300g environ sont divisés en quatre groupes :

- **Groupe Véhicule :** 18 rats ayant reçu une double injection intrahippocampique bilatérale d'une solution de Ringer lactate Lavoisier, Paris, France).
- **Groupe Abeta :** 17 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution de Ringer lactate puis de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42. (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) non agrégé.
- **Groupe Tau :** 18 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L (Pr. R.L. Klein, University of Shreveport, Louisiane, USA) puis de 4 µL de la solution de Ringer lactate.
- **Groupe Abeta-Tau :** 16 rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L puis de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 non agrégé.

La substance véhicule utilisée correspond désormais au Ringer lactate pour la préparation du peptide Aβ42 et la dilution du vecteur AAV-Tau. Les injections ont été réalisées suivant trois lots de six animaux pour chaque groupe. Les résultats d'évaluation de la mémoire, obtenus pour les différents lots, sont alors rassemblés entre-eux. Le déséquilibre observé entre les effectifs des différents groupes s'explique par la perte de quelques animaux lors des injections intracérébrales.

L'évaluation de la mémoire se fait selon le troisième protocole de RAWM (version à trois positions de plateforme) qui est effectué à 12 semaines post-injection. Les animaux sont sacrifiés lors de la 13ème semaine post-injection afin de prélever leur cerveau pour les analyses histologiques et biochimiques. Un tiers des cerveaux prélevés chez chacun des groupes sont paraffinés pour la réalisation de l'immunohistologie. Les autres cerveaux sont cryo-conservés pour la réalisation d'analyses biochimiques ultérieures.

Procédure d'immunohistologie :

L'évaluation des lésions histologiques est réalisée suivant la même procédure que celle utilisée lors de l'étude préliminaire. La liste des anticorps utilisés pour l'immunohistologie est présentée dans le **tableau 11.**

Analyses biochimiques (Western-Blot) :

- Paramètres étudiés :

- Réactivité astrocytaire évaluée par une augmentation du niveau d'expression de la GFAP (50 kDa).
- Réactivité microgliale évaluée par une augmentation du niveau d'expression de la protéine Iba1 (17 kDa).
- Perte neuronale évaluée par une diminution du niveau d'expression de la protéine NeuN (46 kDa, 48 kDa et 66 kDa).
- Augmentation des marqueurs pro-apoptotiques évaluée par l'augmentation du ratio caspase 3 clivée (17 et 19 KDa) sur caspase 3 totale (35 kDa) et par l'augmentation du niveau d'expression de la protéine Bax (20 kDa).

- Préparation des tissus :

La semaine du sacrifice (13 semaines post-injection), huit animaux de chaque groupe sont utilisés pour les analyses biochimiques. Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique (60 mg/kg, pentobarbital à 54,7 mg/mL, Ceva Santé Animale, Libourne, France). Une perfusion corps entier d'une solution de 150 mL de PBS (154 mM NaCl, 1,543 mM KH2PO4, 2,7 mM Na2HPO4,7H_2O, pH 7.2) à 4°C est alors réalisée par voie intracardiaque. Le cerveau est alors rapidement prélevé, puis disséqué en quatre régions d'intérêts : l'hippocampe, le cortex frontal, le cortex pariétal et le striatum. Chacune de ces régions est alors pesée puis conservée à -80°C, après une immersion dans un bain d'azote liquide. Le jour des analyses, les tissus sont décongelés puis homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de tissu (Potter de Thomas, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Allemagne) dans 10 volumes d'un tampon de lyse : 50 mM de Tris-HCl (Trizma® base T1503, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), pH 6.8 ; 50 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 50 mM de NaF, 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride, 1% (volume/poids) d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (P8340, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), 1% (volume/volume) d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (P5726, Sigma-Aldrich). Une sonication des lysats (Sonifier 450, Branson) est ensuite réalisée pendant 10 secondes (Duty cycle 20, Output control 2), puis ils sont centrifugés à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont ensuite collectés et analysés par fluorescence grâce au kit d'analyse protéique Qubit® (Invitrogen, distributeur de Fisher Scientific, Illkirch, France), afin d'obtenir leur concentration en protéines.

- Electrophorèse sur gel :

Les échantillons sont préparés à une concentration de 40 µg de protéines dans 25 µL de solution finale, par ajout des solutions suivantes : NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X, NP0007 Invitrogen) et NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X, Invitrogen). Les échantillons sont ensuite dénaturés par la chaleur (100°C pendant 5 minutes), puis déposés sur les gels Novex™ 4-12% Tris-Glycine (Invitrogen) ainsi qu'avec le standard de poids moléculaire SeeBlue® Plus2 Pre-stained (8µL, LC 5925, Invitrogen). Les gels sont préalablement placés dans une chambre électrophorétique et immergés dans la solution tampon NuPAGE® MES SDS Running Buffer contenant la solution NuPAGE® antioxidant. Un courant de 200 V est ensuite appliqué pendant 35 minutes. Cette durée peut être adaptée afin que

Anticorps	Cible	Classe	Espèce hôte	Dilution	Fournisseur
Primaires	Anti-GFAP	Polyclonal	Lapin	1/500	Cell signaling, distributeur Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France
	Anti-Iba1	Polyclonal	Chèvre	1/500	Abcam, Cambrige, UK
	Anti-NeuN	Polyclonal	Souris	1/500	Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France
	Anti-Bax	Polyclonal	Souris	1/500	Cell signaling, distributeur Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France
	Anti-pro-Caspase 3	Polyclonal	Souris	1/500	Cell signaling, distributeur Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France
	Anti-Caspase 3 clivée	Polyclonal	Souris	1/500	Cell signaling, distributeur Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France
Secondaires	Anti-Ig de souris	Polyclonal	Mouton	1/1000	GE Healthcare, distributeur Fisher Scientific, Illkirch, France
	Anti-Ig de lapin		Chêvre		Cell signaling, distributeur Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France
	Anti-Ig de chèvre		Ane		Santa Cruz Biotechnology, Distributeur Clinisciences, Nanterre, France

<u>Tableau 12</u> : Listes des différents anticorps utilisés pour les analyses biochimiques.

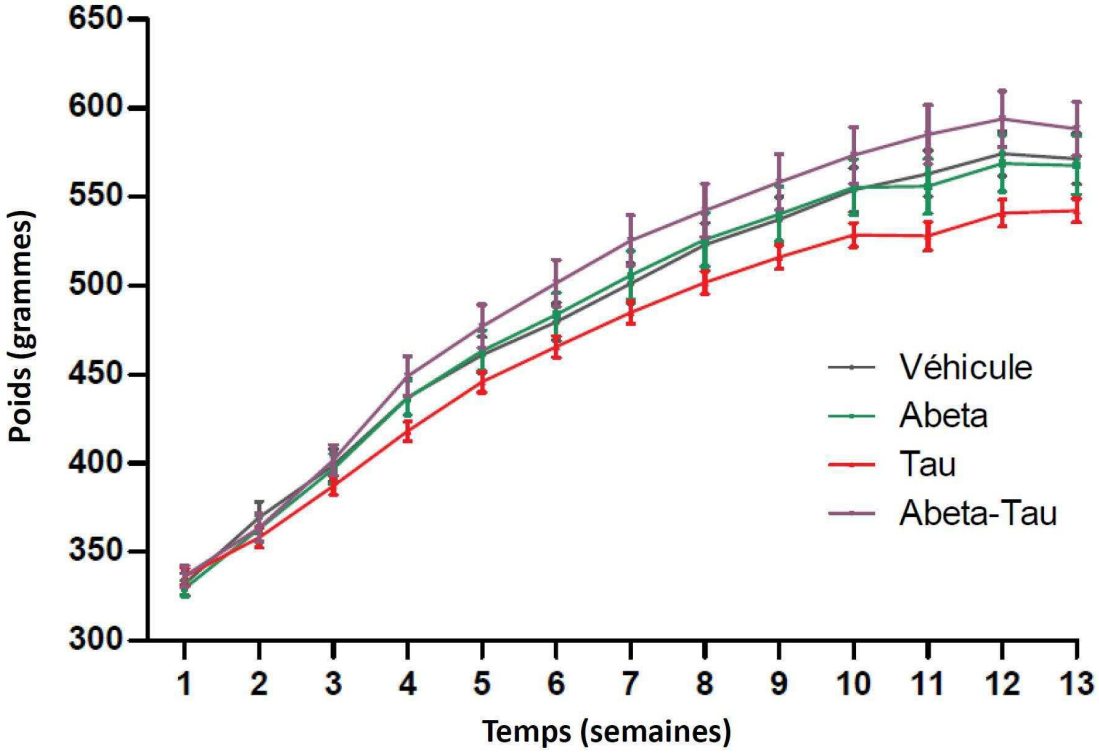
les protéines migrent bien jusqu'en bas du gel et ainsi, assurer la bonne séparation des protéines de faible poids moléculaire.

- Transfert sur membrane et révélation par immunomarquage :

Le transfert se fait ensuite sur membrane de nitrocellulose grâce au kit de transfert iBlot® Dry blotting system, avec un courant de 20 V durant sept minutes. Les membranes de nitrocellulose sont ensuite rincées pendant 10 minutes dans un tampon TBST (Tris-buffered saline/Tween : 20 mM Tris–HCl ; 150 mM NaCl, pH 7.5 ; 0.05% Tween 20), puis sont plongées pendant deux heures dans une solution de TBST contenant 5% de BSA (Bovine Serum Albumin low IGG, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) afin de bloquer les sites antigéniques non spécifiques. Les membranes sont alors incubées pendant une nuit à 4°C, dans le tampon de blocage contenant les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêts (**tableau 12**). Les membranes sont ensuite rincées dans la solution de TBST puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à l'enzyme HRP (horseradish peroxidase) pendant une heure à température ambiante. Les membranes sont rincées une nouvelle fois puis sont exposées au substrat de l'enzyme HRP : Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), produisant une réaction de chemiluminescence captée avec le système Gbox (GeneSnap software, Syngene, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France). Après deux lavages consécutifs dans le TBST, les membranes sont incubées avec un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine actine (1 :10000) durant une nuit à 4°C. La même procédure de révélation est ensuite suivie, en utilisant le substrat Luminata Classico Substrate (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'analyse des captures d'images obtenues se fait avec le logiciel Gene Tools (Syngene, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France). Les résultats du niveau d'expression des différentes protéines sont alors calculés à partir du ratio protéine / actine et exprimés en unités arbitraires.

- Analyse des résultats

L'analyse des captures d'images obtenues se fait avec le logiciel Gene Tools (Syngene, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France). Les résultats du niveau des différentes protéines sont alors calculés à partir du ratio protéine / actine.



<u>Figure 74</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°3.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Groupe Véhicule : N=18 ; Groupe Abeta : N=17 ; Groupe Tau : N=18 ; Groupe Abeta-Tau N=16.

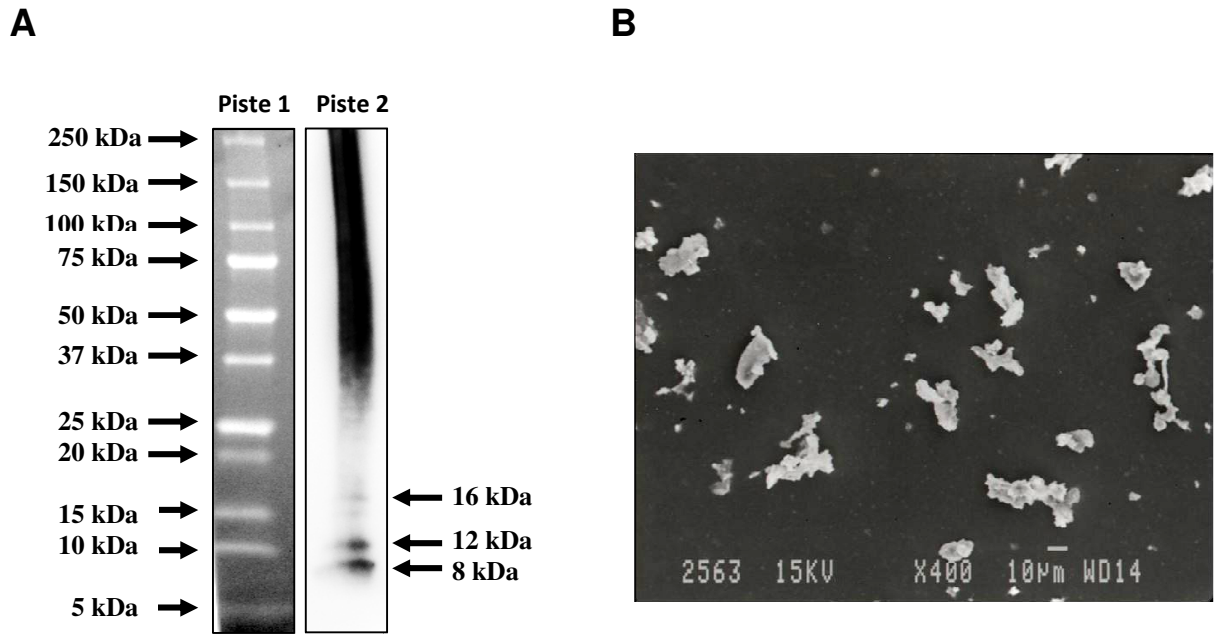
11.3. Résultats

11.3.1. Suivi de l'évolution pondérale des animaux

Les différents traitements (Abeta, Tau ou Abeta-Tau) administrés aux rats, n'ont induit aucun changement au niveau de la prise de poids des animaux, en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 74**).

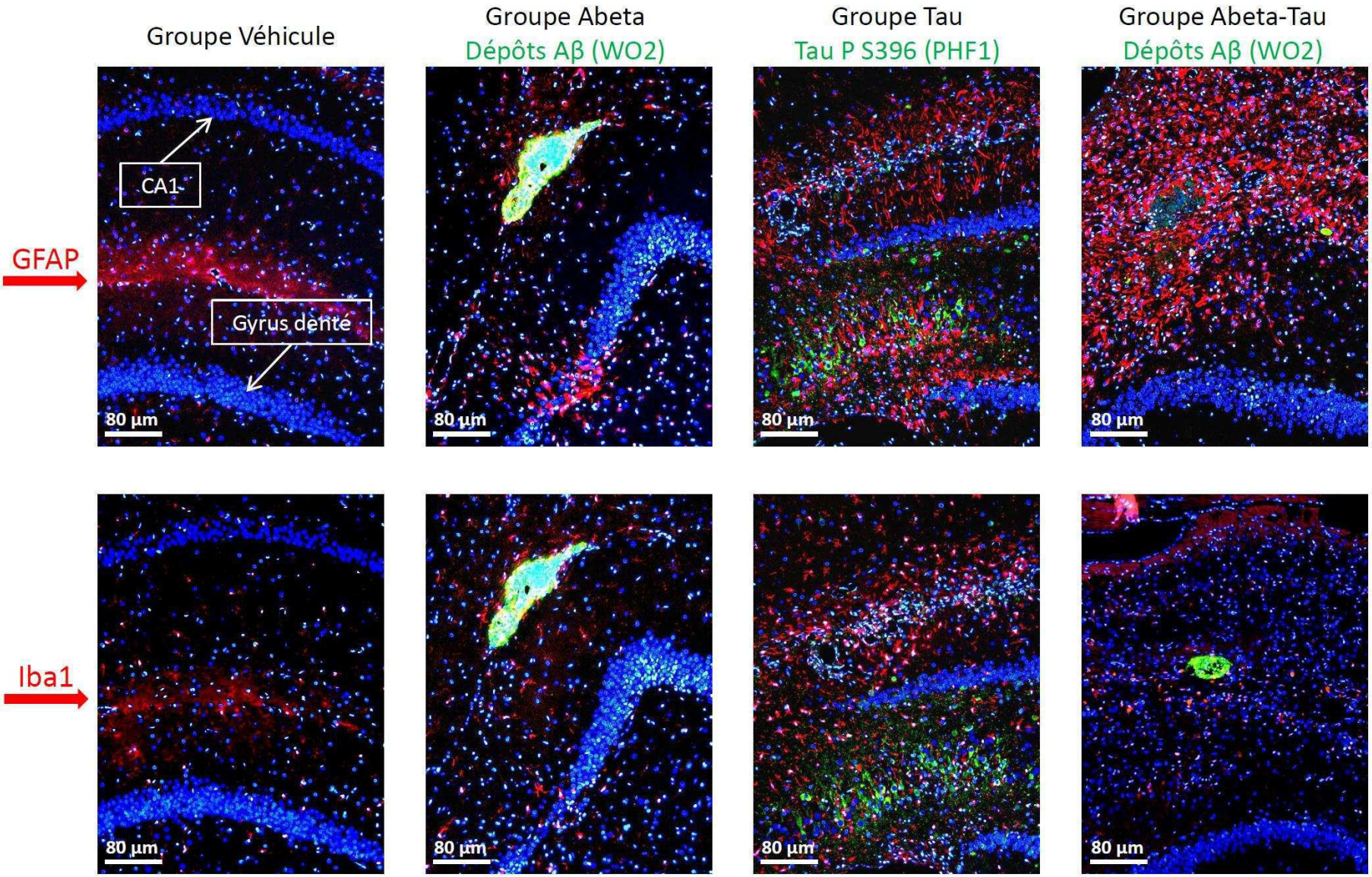
11.3.2. Analyse biochimique du peptide Aβ injecté

Une analyse de la migration électrophorétique du peptide Aβ42 par Western-Blot a permis d'évaluer le niveau d'agrégation du peptide présent dans la solution injectée (**figure 75**). Ce dernier est présent sous des formes oligomèriques, allant du dimère (8 kDa) à des formes plus agrégées (**figure 75 A**). Mais contrairement à la solution de peptide Aβ pré-agrégé injectée lors des expérimentations précédentes (**figure 35 B**), cette solution ne contient pas de formes fibrillaires (**figure 75 B**). Seuls des cristaux provenant probablement des sels contenus dans la solution de Ringer lactate sont observés par microscopie électronique à balayage.



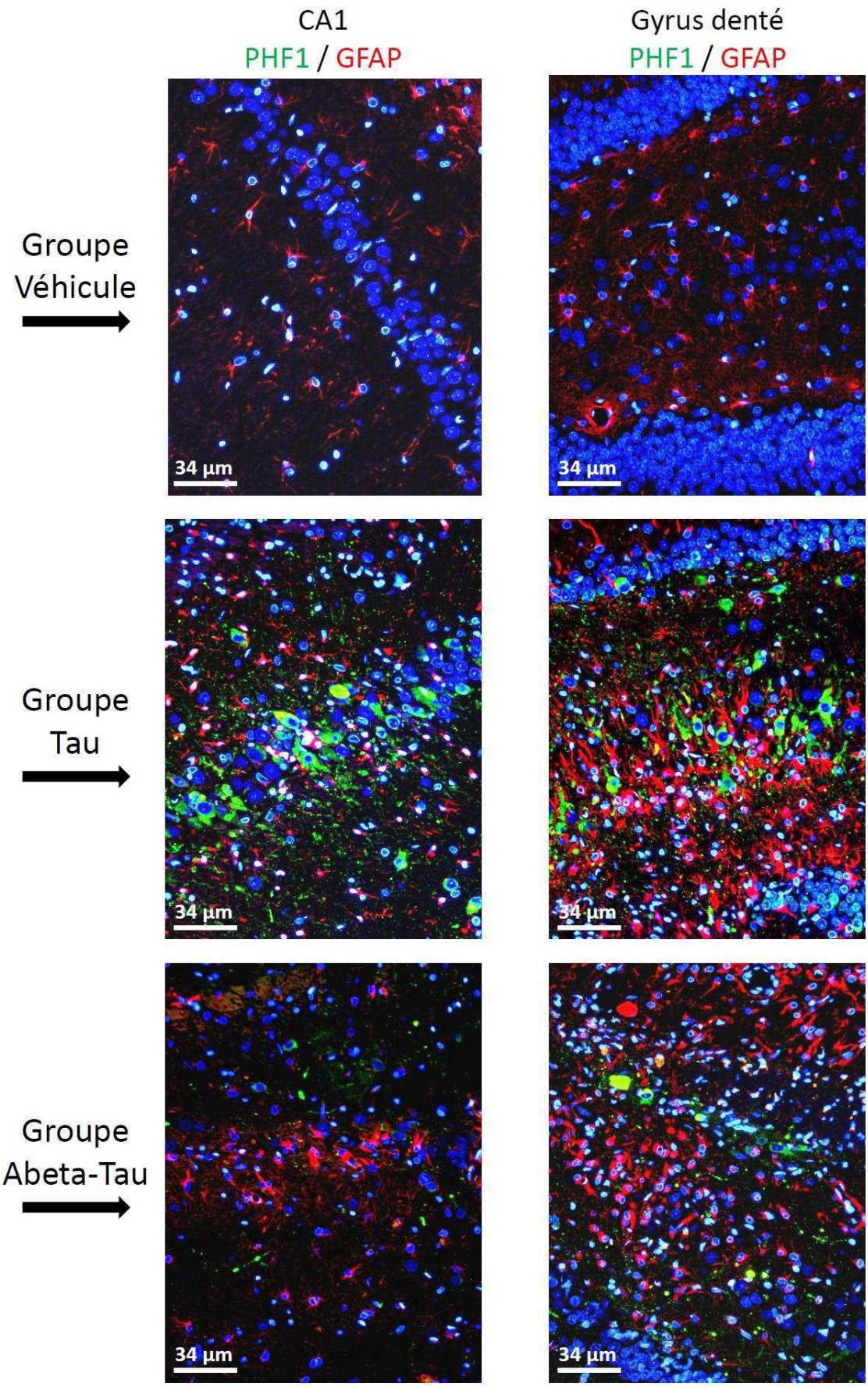
<u>Figure 75</u> : Etat d'agrégation du peptide β-amyloïde 1-42 dilué dans le Ringer lactate.

L'Aβ1-42 a été dilué dans l'eau distillée UHQ stérile à la concentration de 2,5 nmol/µL puis incubé pendant 48 heures à 37°C. Un Western-Blot (**A**) et une observation par microscopie électronique à balayage (**B**) ont été réalisés à partir de cette solution pour définir l'état d'agrégation de ce peptide avant l'injection dans le cerveau du rat. Pour le Western-Blot, la membrane a été incubée dans une solution contenant un anticorps primaire monoclonal murin anti-Aβ1-42 humain (clone 4G8, 1/500), puis révélée après incubation dans l'anticorps secondaire anti-Ig de souris (1/1000) et application du révélateur Luminata Classico en utilisant l'imageur GBox (logiciel Gene Snap, Syngene). Une analyse de la masse moléculaire a été effectuée en utilisant le logiciel GeneTools (piste 1 : poids moléculaire Biorad 5-250 kDa et piste 2 : Aβ1-42).



<u>Figure 76</u> : Co-marquage des lésions de type dépôt amyloïde et neurofibrillaire avec les astrocytes ou les cellules microgliales.

Des astrocytes (GFAP, en rouge) ainsi que des cellules microgliales (Iba1, en rouge) réactives, sont observées au niveau du site d'injection chez l'ensemble des groupes, et également à proximité des lésions de type neurofibrillaire de Tau (PHF1, en vert) et dépôts de peptide Aβ (WO2, en vert).



<u>Figure 77</u> : Comparaison des marquages de la protéine Tau phosphorylée ainsi que de la réaction gliale associée, chez les groupes Tau et Abeta-Tau.

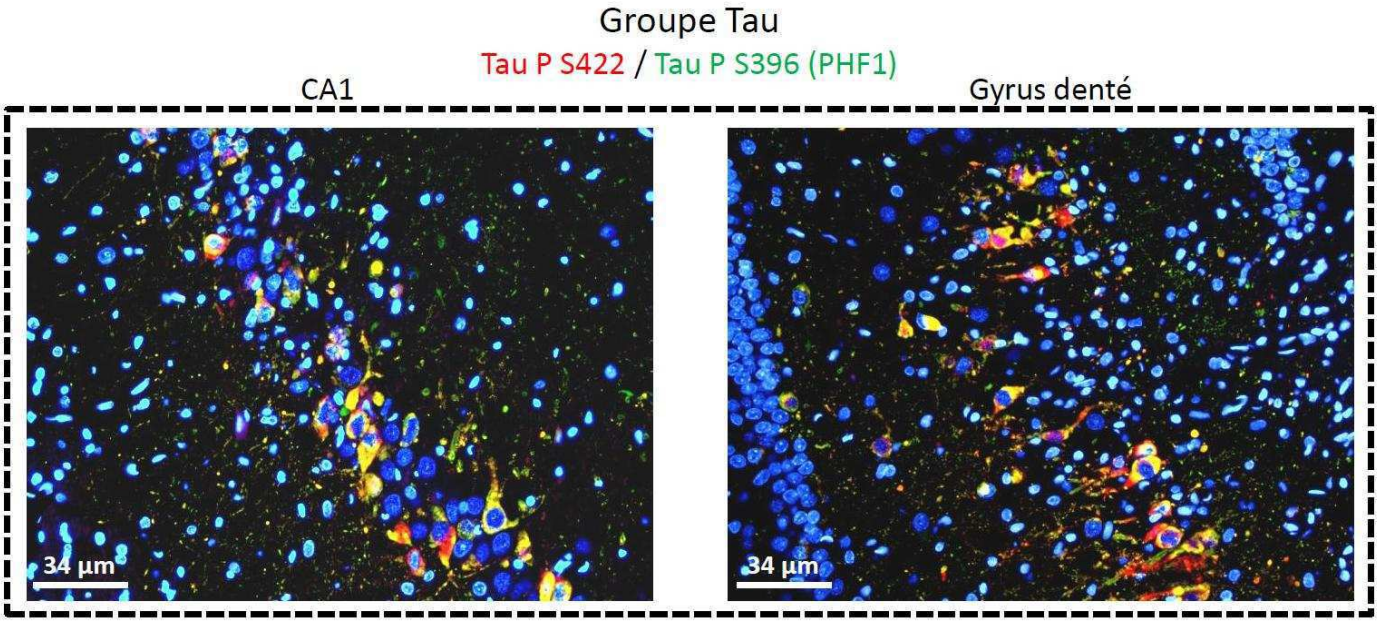
La protéine Tau phosphorylée est marquée (en vert) avec l'anticorps PHF1. Les astrocytes et la microglie sont marqués (en rouge) par les anticorps anti-GFAP et anti-Iba1 respectivement. Les marquages de la protéine Tau sont moins nombreux chez le groupe Abeta-Tau.

11.3.3. Observation histologique des différentes lésions

Des dépôts de peptide Aβ sont observés au niveau du site d'injection (entre la couche CA1 et le gyrus denté) chez les rats du groupe Abeta et Abeta-Tau (**figure 76**). Cette observation démontre que le peptide Aβ42, injecté sous forme de monomère ou de petits polymères solubles, est capable de s'agréger *in vivo* chez le rat. Des inclusions de la protéine Tau phosphorylée sur la sérine en position 396 (PHF1) sont retrouvées au niveau des couches CA1 et du gyrus denté pour les groupes Tau et Abeta-Tau (**figure 77**) mais de manière moins marquée chez le groupe Abeta-Tau. Des co-marquages réalisés chez le groupe Tau ont permis de mettre en évidence que les inclusions de la protéine Tau observées, sont constituées à la fois de protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée (superposition des marquages de PHF1 et de Tau P S422 apparaissant en jaune : **figure 78**).

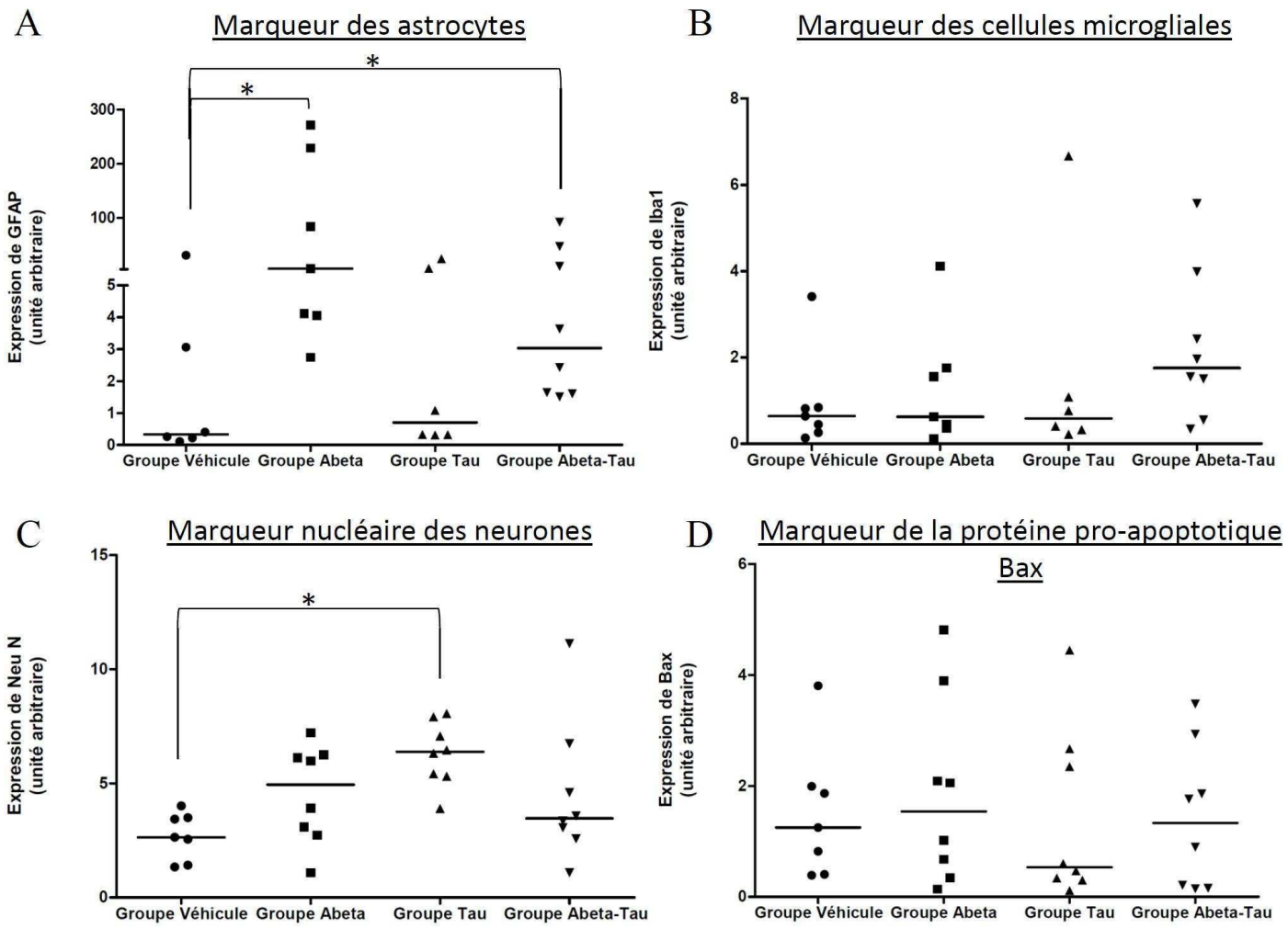
Ces deux types de lésions histologiques (dépôts de peptide Aβ et inclusions de Tau phosphorylée) sont associés à une réactivité des cellules gliales participant notamment à l'immunité innée (les astrocytes et les cellules microgliales), mais cette réaction semble plus marquée avec les astrocytes (**figure 76 et 77 :** GFAP).

Du point de vue de l'aspect morphologique des couches neuronales, une atteinte concernant la couche dorsale du gyrus denté et de la couche CA1 est observée essentiellement chez les rats du groupe Abeta-Tau (**figure 76 et 77**).



<u>Figure 78</u> : Co-marquage de la protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée.

La protéine Tau phosphorylée (sur sérine 396) est marquée (en vert) avec l'anticorps PHF1, et La protéine Tau anormalement phosphorylée (sur sérine 422) est marquée (en rouge) avec l'anticorps anti-Tau P S422. Une co-localisation des deux formes de la protéine Tau est observée (en jaune), indiquant que la protéine peut être à la fois phosphorylée et anormalement phosphorylée.



<u>Figure 79</u> : Résultats des analyses biochimiques réalisées sur les hippocampes de chaque groupe.

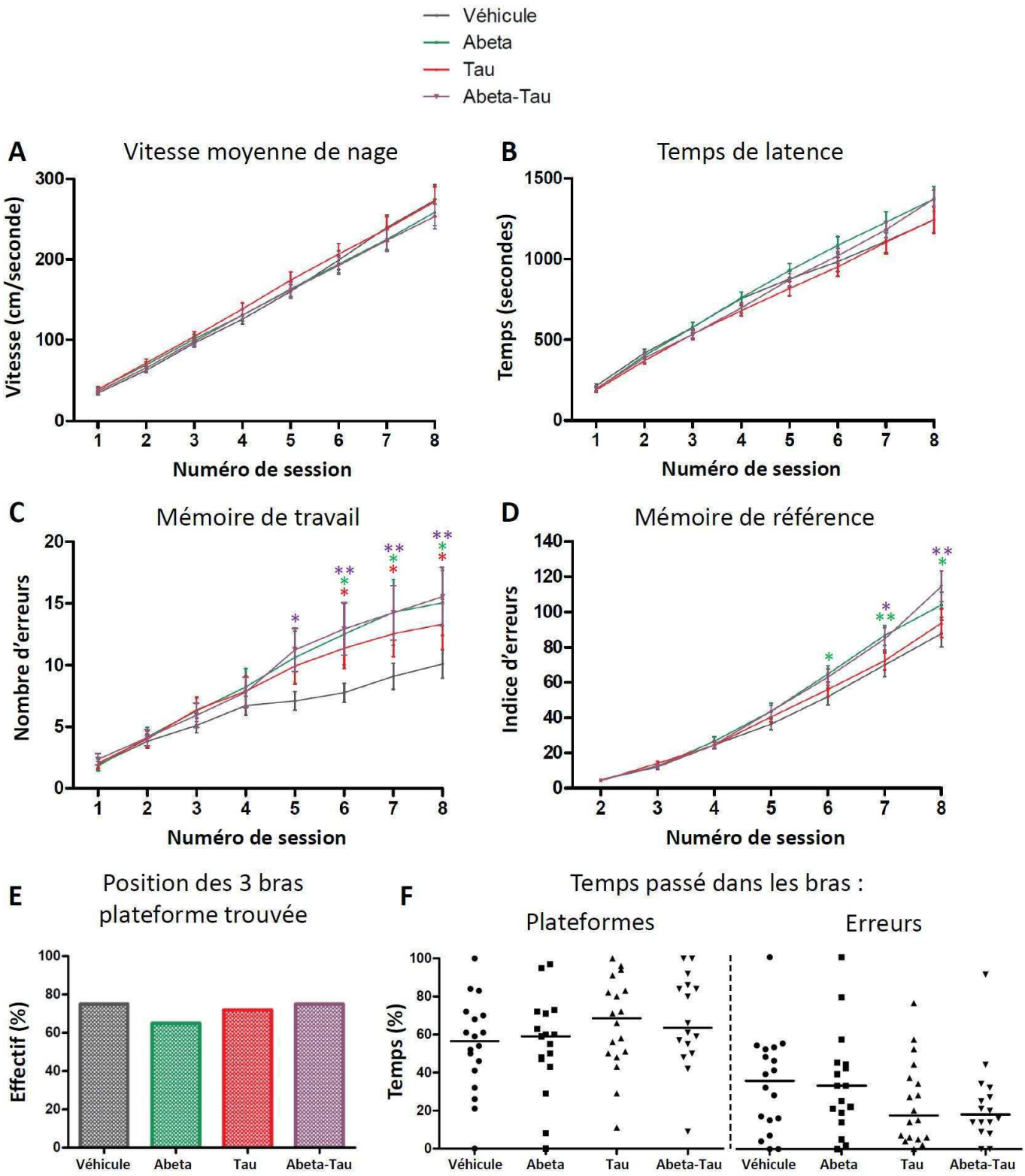
L'effet des différents traitements sur le niveau de GFAP (**A**), d'Iba1 (**B**), de NeuN (**C**) et de Bax (**D**), est analysé par Western-Blot puis comparé au groupe Véhicule à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Chaque point représente un niveau de protéine obtenu pour un rat et les traits noirs représentent les médianes obtenues pour chaque groupe. *: $P \leq 0.05$ par comparaison au groupe Véhicule. N=8 pour chaque groupe.

11.3.4. Analyse biochimique

Lors des analyses réalisées par Western-Blot sur des homogénats d'hippocampes prélevés sur chaque groupe de rats, nous avons observé une augmentation significative du niveau de GFAP induite par l'injection de peptide Aβ42 (groupe Abeta et Abeta-Tau). Cette augmentation semble plus marquée chez le groupe Abeta que chez le groupe Abeta-Tau. En revanche, à la différence des observations réalisées en histologie, l'injection de vecteur AAV-Tau n'a induit aucun changement sur ce paramètre (**figure 79 A**).

Aucune autre modification n'est observée sur les différents paramètres testés au niveau de l'hippocampe, à l'exception d'une augmentation du niveau de NeuN induit par l'injection du vecteur AAV-Tau (**figure 79 C**). Les résultats obtenus avec le niveau de la protéine caspase et caspase clivées ne sont pas montrés car nous avons obtenus un signal trop faible avec la caspase clivée pour pouvoir l'analyser. Toutefois, ce manque de signal obtenu avec la caspase clivée est cohérent avec le manque d'effet obtenu au niveau de la protéine pro-apoptotique Bax (**figure 79 D**).

Les analyses réalisées sur les homogénats des autres parties du cerveau (cortex frontal, cortex pariétal, striatum) n'ont montré aucun changement induit par les différents traitements sur les paramètres analysés (résultats non présentés).



<u>Figure 80</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire.

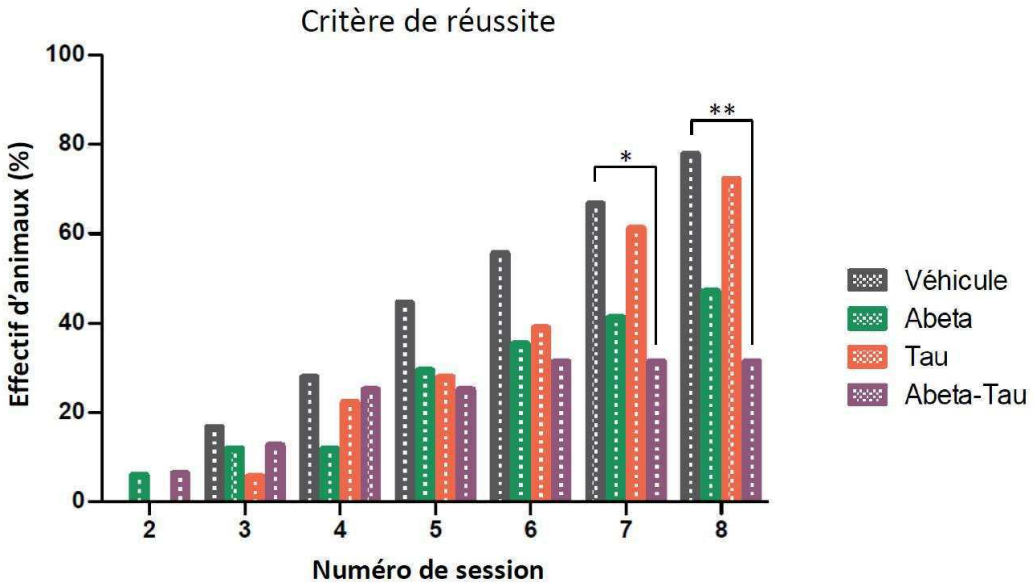
A, **B**, **C** et **D** représentent des paramètres analysés lors de la phase d'apprentissage. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$).
E et **F** sont des paramètres évalués lors du test de rétention (sans plateforme). **E** représente le nombre de rats ayant trouvé la position des trois plateformes, **F**, le temps passé pour chaque rat dans les bras plateformes et les quatre bras erreurs. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher (**E**) ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis (**F**) suivi du test *post-hoc* U de Mann-Whitney en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=18 ; Groupe Abeta : N=17 ; Groupe Tau : N=18 ; Groupe Abeta-Tau N=16.

11.3.5. Evaluation de la mémoire

Les différents traitements n'ont pas induit de changement sur la vitesse moyenne de nage et sur le temps de latence (**figure 80 A et B**) en comparaison avec le groupe Véhicule.

En revanche, l'ensemble des traitements ont induit une augmentation des erreurs de type mémoire de travail (**figure 80 C**). Cette augmentation du nombre d'erreurs devient significative à partir de la session 6 pour les groupes Abeta et Tau, et significative à partir de la session 5 puis très significative (**) à partir de la session 6 pour le groupe Abeta-Tau. Une augmentation de l'indice des erreurs de type mémoire de référence est également observée avec les rats ayant reçu une injection de peptide Aβ42 (groupe Abeta et groupe Abeta-Tau : **figure 80 D**). L'écart observé avec cet indice, en comparaison avec le groupe Véhicule, est significatif à partir de la session 6 avec le groupe Abeta, et à partir de la session 7 avec le groupe Abeta-Tau. Cependant, l'écart observé entre le groupe Véhicule et le groupe Abeta-Tau est plus important qu'avec le groupe Abeta, lors de la dernière session de la phase d'apprentissage. Un effet plus marqué sur la mémoire de référence avec le groupe Abeta-tau, est confirmé avec le paramètre de critère de réussite au test (**figure 81**). Une baisse significative du nombre de rats sortant positifs à ce critère est notée avec le groupe Abeta-Tau, en comparaison avec le groupe Véhicule, à partir de la session 7, alors qu'une simple tendance à la baisse (non significative) est observée avec le groupe Abeta. Aucun changement sur les paramètres concernant la mémoire de référence, n'est observé avec le groupe Tau.

Aucun effet lié aux différents traitements n'a été noté lors du test de rétention. Ceci ne permet donc pas de confirmer la perturbation de la mémoire de référence observé avec les groupes Abeta et Abeta-Tau (**figure 80 E et F**).



<u>Figure 81</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve, lors d'une session, les trois plateformes en comettant un maximum d'une erreur de mémoire de référence. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. *: P≤ 0.05 ; **: P≤ 0.01 par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=18 ; Groupe Abeta : N=17 ; Groupe Tau : N=18 ; Groupe Abeta-Tau N=16.

11.4. Discussion

Cette étude a permis de confirmer la présence des lésions histologiques associées à une neuroinflammation déjà observée lors de l'expérience n°1 (après 12 semaines post-injection). En revanche, la nouveauté réside dans le fait que le peptide Aβ42 a été injecté sous une forme non agrégée, contrairement aux expériences précédentes. Sous cette forme, le peptide aurait pu induire un effet neurotoxique de façon aigüe, puis être rapidement éliminé. A l'inverse, nous avons constaté que le peptide s'est agrégé *in vivo,* est toujours présent même après trois mois, et ne semble pas avoir induit une réelle neurotoxicité (pas de baisse de NeuN ou d'augmentation des marqueurs pro-apoptotique au Western-Blot), mais plutôt une neuroinflammation chronique liée à une réactivité des astrocytes (augmentation du niveau de la GFAP en Western-Blot). Cette astrocytose réactionnelle est retrouvée de manière spécifique dans l'hippocampe, chez les rats des groupes Abeta et Abeta-Tau, et pourrait être à l'origine des perturbations de la mémoire (référence et travail) retrouvées chez ces deux groupes.

Un autre point est que cette astrocytose observée par Western-Blot, est limitée à l'hippocampe. Cette constatation permet de confirmer que les injections réalisées permettent bien de cibler l'hippocampe de manière spécifique et donc de mimer une phase précoce de la MA (voir chapitre 1.3.2). De plus, les perturbations de la mémoire rencontrées avec les trois différents traitements, concernent essentiellement la mémoire de travail (spécifique du bon fonctionnement de l'hippocampe : voir chapitre 3.1.3.2), les effets observés au niveau de la mémoire de référence (groupes Abeta et Abeta-tau) n'ayant pas été confirmés lors du test de rétention.

Au sujet du groupe Tau, les inclusions de la protéine Tau phosphorylée sur des sites considérés comme pathologiques, n'ont pas induit de changement sur les paramètres biochimiques analysés, excepté une augmentation du marqueur neuronale NeuN. Les astrocytes et les cellules microgliales réactives, ainsi que les changements de l'aspect morphologique des couches neuronales observés en histologie, doivent être localisés à proximité du site d'injection et ne concernent donc pas l'hippocampe sur son ensemble (donc pas visible avec un Western-Blot réalisé sur l'hippocampe entier). L'augmentation du niveau de NeuN nous paraît surprenante et doit être confirmée lors d'une prochaine expérience. Néanmoins, nous pensons que l'injection de ce vecteur pourrait induire une neurogenèse suite à une différenciation de cellules souches. En effet, un réservoir de cellules souches capable de se différencier en neurones, a été identifié à proximité du gyrus denté chez le rat (Kiyota et al., 2012). L'injection du vecteur AAV-Tau, à cette dose, ne suffit donc pas à induire une réelle perte neuronale ainsi que la neuroinflammation observée chez les rats traités avec le peptide Aβ42. Pourtant, une perturbation spécifique de la mémoire de travail est observée dans le RAWM avec ce traitement (déjà décrite dans l'expérience n°2 et par Dayton et Mustroph). Cette altération de la mémoire de travail ne proviendrait donc pas d'une perte de neurones, mais plutôt d'un dysfonctionnement des neurones de l'hippocampe. Nous émettons l'hypothèse que les inclusions intracellulaires liées à la surexpression de la protéine Tau mutée pourraient perturber le transport vésiculaire et donc stopper la transmission synaptique.

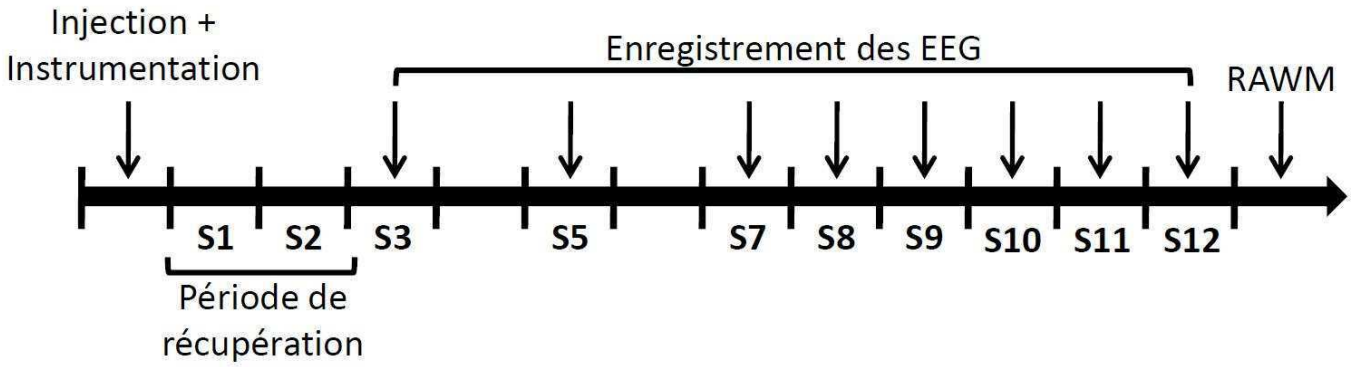
Un des aspects plus décevant de cette expérience réside dans le fait que les rats du groupe Abeta-Tau n'ont pas présenté une perturbation de la mémoire réellement plus importante que les rats ayant reçu l'injection seule du peptide Aβ42. Nous nous attendions, au minimum, à des effets additionnels avec l'injection concomitante des deux substances, ce qui ne semble pas être le cas.

Toutefois, cette co-injection intrahippocampique du peptide Aβ42 sous forme non agrégée et du vecteur AAV-Tau P301L, permet bien de répondre aux critères recherchés pour le développement d'un modèle animal de la MA :

- Les deux types de lésions histologiques sont retrouvés au niveau de plusieurs couches neuronales de l'hippocampe.
- Ces lésions entrainent une perturbation de la mémoire qui constitue un paramètre facilement évaluable à l'aide du RAWM.
- Les lésions de type neurofibrillaire induites par le vecteur AAV9 Tau P301L, semblent progressives : peu de marquage de la protéine Tau phosphorylée observé après deux semaines et neuf semaines post-injection lors d'expérimentations précédentes, et semblent également durables dans le temps.

Ce modèle de MA présentant les deux types de lésions, permettrait alors de tester l'efficacité d'une stratégie thérapeutique qui agirait sur les deux caractéristiques de la MA (les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire), car, même si les effets du peptide Aβ42 et de la protéine Tau mutée ne s'additionnent pas, ils semblent induire des perturbations de la mémoire indépendamment l'un de l'autre.

Afin d'éclaircir ce dernier point, nous avons entrepris de caractériser les effets des différentes substances injectées, sur un autre paramètre : l'analyse des EEG. Dans la littérature, il a été décrit des changements de l'architecture du sommeil (analysable par les EEG) et de l'activité électrique cérébrale, avec notamment une baisse de la quantité de REM et de la puissance des rythmes θ, chez des modèles animaux de la MA (voir chapitre 4.3). Ce type d'analyse permettrait également de répondre à notre dernier critère : la réalisation d'un suivi longitudinal de l'évolution des altérations dans le temps. Nous avons constaté qu'il n'est pas évident de répéter un test de navigation spatiale sans introduire un biais (voir expérience n°1) et que l'observation histologique des lésions nécessitant le sacrifice des animaux, il faudrait donc inclure de gros effectifs d'animaux pour pouvoir pratiquer ces évaluations à plusieurs temps post-injection, ce qui ne paraît pas envisageable notamment pour des raisons éthiques. L'analyse des enregistrements électroencéphalographiques paraît donc être une bonne alternative car ces mesures peuvent être répétées à plusieurs reprises sur les mêmes animaux.



<u>Figure 82</u> : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°4

S : Semaine post-injection.

12. Expérience n°4

12.1. Introduction

Cette expérimentation a été conduite dans le but de caractériser les effets des trois traitements, réalisés lors de l'expérience précédente, sur l'activité cérébrale globale des animaux et sur d'éventuelles perturbations de leur cycle nycthéméral ou de l'architecture de leur sommeil, par exemple avec un changement de la proportion de sommeil paradoxale pendant les phases de sommeil.

Des travaux ont déjà été réalisés dans ce domaine mais restent relativement peu nombreux et parfois contradictoires. Il n'existe à ce jour, aucune étude publiée sur les effets des lésions de type neurofibrille de Tau (voir chapitre 4.3). Néanmoins, une perturbation des rythmes circadiens a été décrite chez des souris transgéniques exprimant à la fois les dépôts amyloïdes et les DNF (Sterniczuk et al., 2010). De plus, une baisse de la quantité de sommeil REM apparaît de manière précoce (avant la formation des dépôts amyloïdes) chez des souris transgéniques (Jyoti et al., 2010). Du point de vue de l'activité électrique du cerveau, une baisse de la puissance de l'onde θ est décrite dans la plupart des cas, que se soit chez des souris transgéniques exprimant les dépôts amyloïdes, ou après une injection de peptide Abeta intrahippocampique chez le rat (Rubio et al., 2012)(Villette et al., 2010).

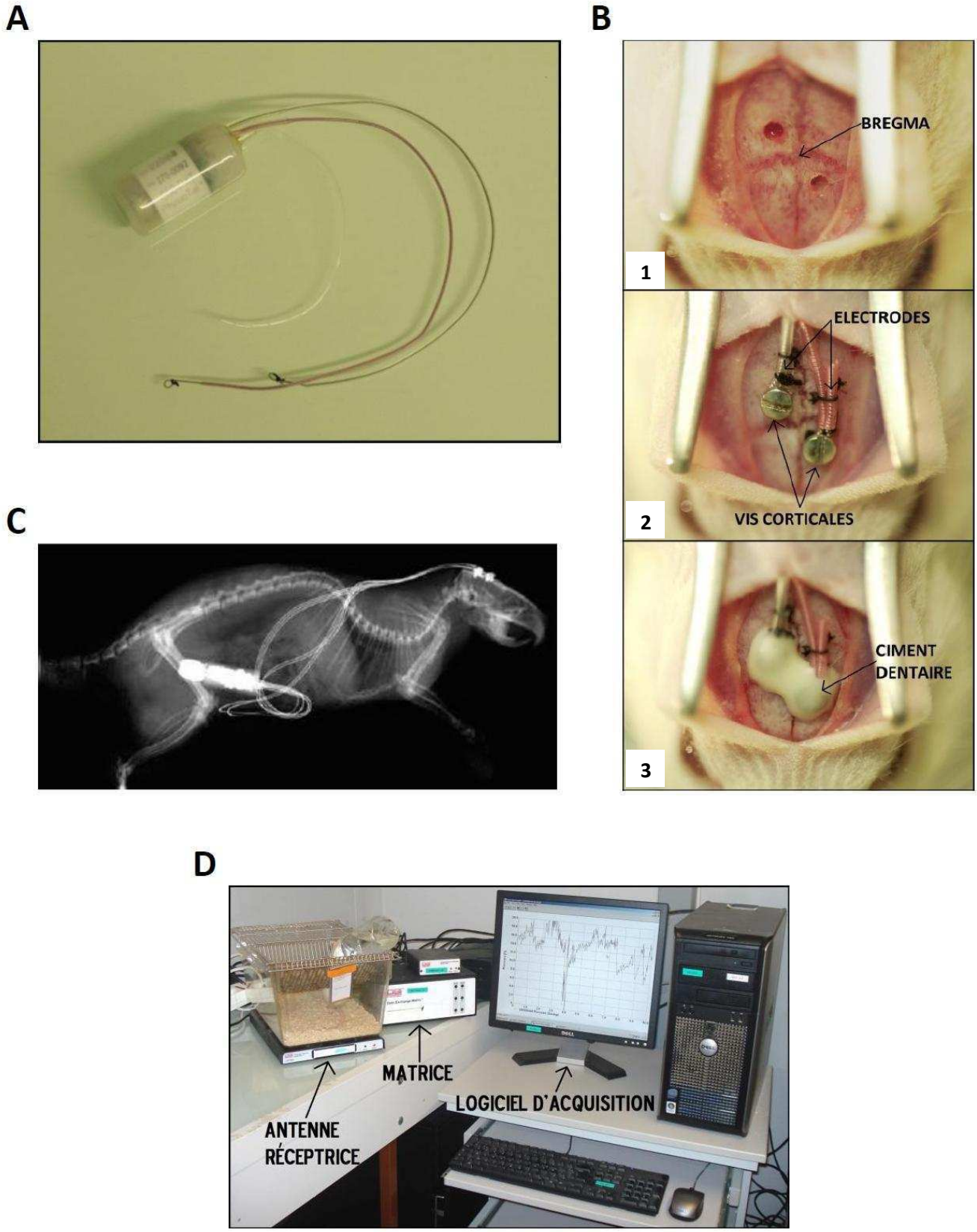
12.2. Matériels et méthodes

12.2.1. Procédure expérimentale

Des rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) de 300g environ sont divisés en quatre groupes suivant la même procédure que l'expérience n°3 :

- **Groupe Véhicule :** sept rats ayant reçu une double injection intrahippocampique bilatérale d'une solution de Ringer lactate (Lavoisier, Paris, France).
- **Groupe Abeta :** cinq rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution de Ringer lactate puis de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) non agrégé.
- **Groupe Tau :** sept rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L (Pr. R.L. Klein, University of Shreveport, Louisiane, USA) puis de 4 µL de la solution de Ringer lactate.
- **Groupe Abeta-Tau :** sept rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant $2,1 .10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L puis de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 non agrégé.

Les animaux sont instrumentés avec le système de mesure des EEG (électrodes plus radio-émetteur) immédiatement après les injections intracérébrales, lors d'une même chirurgie. Les enregistrements d'EEG sont effectués à partir d'une période de récupération de trois semaines, puis à différents temps jusqu'à la 12ème semaine post-injection (**figure 82**). Une évaluation de la mémoire est réalisée la 13ème semaine post-injection, à l'aide du RAWM avec la procédure à trois positions de plateforme. Au vu du manque d'effet retrouvé dans les tests de rétention et sur les paramètres de vitesse de nage et du temps de latence, nous avons choisi d'étudier seulement les paramètres concernant les erreurs de type mémoire de travail et mémoire de référence dans la phase d'apprentissage.



<u>Figure 83</u> : Implantation du radio-émetteur et des électrodes et présentation du poste d'enregistrement des EEG.

A : Radio-émetteur ; **B** : Implantation des électrodes de part et d'autre du point bregma à l'aide des vis d'encrage ; **C** : Image radiographique d'un rat instrumenté (source : Data Sciences International) ; **D** : Poste d'enregistrement des EEG avec l'antenne réceptrice placé sous la cage et transferant les données à un ordinateur via une matrice.

12.2.2. Technique de télémétrie

Les enregistrements d'EEG sont réalisés par télémétrie. C'est une technique permettant de mesurer certains paramètres physiologiques en s'affranchissant du stress subi par l'animal lors de certaines manipulations. Pour cela, des électrodes reliées à un radio-émetteur sont implantées par chirurgie chez l'animal (**figure 83 A, B et C**). Les électrodes captent un signal électrique qui est transmis à l'émetteur, puis envoyé sous forme d'ondes radio à une antenne réceptrice positionnée sous la cage de l'animal. L'antenne est connectée à un ordinateur par l'intermédiaire d'une matrice qui transforme le signal reçu en signal numérique. Un logiciel d'acquisition permet alors de retranscrire les informations sous forme de résultats exploitables par un opérateur (**figure 83 D**).

Cette technique présente l'avantage de pouvoir réaliser des enregistrements d'EEG en continu donc de réaliser un suivi longitudinal de l'évolution de l'activité électrique du cerveau ainsi que des cycles éveil/sommeil d'un animal. De plus, les animaux ne sont reliés à aucun appareil et ne sont soumis à aucune contention, ce qui permet de réaliser des enregistrements lors d'un comportement « naturel » des animaux.

12.2.3. Implantation des électrodes et de l'émetteur.

Les injections intracérébrales sont d'abord réalisées sous anesthésie au pentobarbital, en suivant la même procédure que dans l'expérience n°3. A la fin de la dernière injection, les animaux sont retirés du cadre de stéréotaxie pour être placés sous anesthésie gazeuse (Isoflurane, Axience, Pantin, France), l'effet du pentobarbital n'étant efficace que 45 minutes environ. L'instrumentation des animaux se déroule alors suivant cette procédure :

- L'ensemble du matériel chirurgical est préalablement autoclavé.
- L'animal est placé en décubitus dorsal, le temps de l'implantation du radio-émetteur.
- La température de l'animal est maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante avec contrôleur de température (CMA Microdialysis, Kista, Suède).
- L'animal est rasé au niveau de l'abdomen.
- La partie rasée est savonnée avec de la povidone iodée savon (VETOQUINOL, Lure, France) puis rincée à l'eau stérile. De la povidone iodée solution 10% (VETOQUINOL, Lure, France) est ensuite appliquée sur la partie rasée à l'aide de compresse stérile.
- Une incision de 3 cm environ est réalisée au niveau de l'abdomen de l'animal.
- Un radio-émetteur (modèle HD-S11, Data Sciences International, MN, USA) est introduit dans la cavité abdominale de l'animal, puis est fixé au péritoine à l'aide de points chirurgicaux.
- Les câbles des électrodes sont passés en sous-cutané jusqu'au niveau de l'incision réalisé au niveau du crâne, lors des injections intracérébrales.
- L'ouverture abdominale est ensuite refermée à l'aide de fils de suture non résorbable pour le plan musculaire, puis à l'aide de fils de suture résorbable pour le plan cutané.
- Les électrodes sont implantées au niveau du crâne, de part et d'autre du point bregma (**figure 83 B**) et fixées à l'aide de vis d'encrage (CMA Microdialysis, Kista, Suède) et de ciment dentaire (Aquacem™, Dentsply, Weybridge, Angleterre).
- Après séchage du ciment dentaire (trois minutes environ), de la povidone iodée solution 10% est déposé à la surface du crâne puis épongé à l'aide de compresses stériles.
- Les plans cutanés sont ensuite suturés à l'aide de fils résorbable.

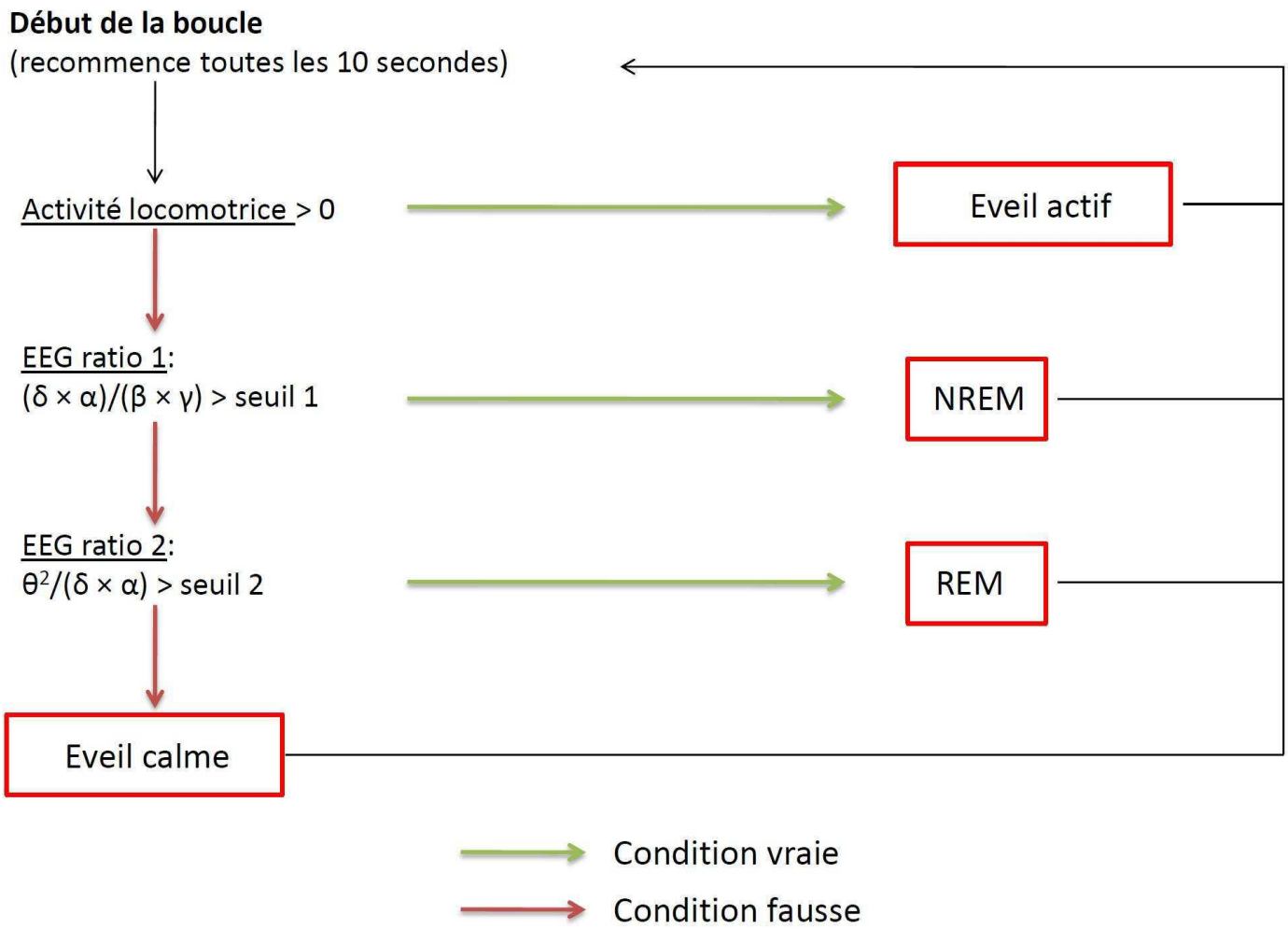


Figure 84 : Représentation schématique de la méthode de détermination informatique des quatre états.

Le ratio 1 correspond à la quantité des ondes du sommeil sur la quantité des ondes de l'activité.
Le ratio 2 correspond à la quantité de l'onde du REM sur la quantité des ondes du sommeil.

- L'animal est déposé sur une couverture chauffante jusqu'à son réveil puis est placé dans une cage individuelle pendant l'ensemble de la période de récupération et des périodes d'enregistrements des EEG.

Suivi postopératoire :

Une injection intramusculaire de 0,6 µg de buprénorphine (Buprecare®) est réalisée à la fin de l'implantation du radio-émetteur, afin que l'effet analgésique soit optimal lors du réveil de l'animal. Les animaux sont observés quotidiennement pendant un minimum de deux semaines, afin de vérifier leur bonne récupération postopératoire. Des soins sont également réalisés quotidiennement pendant cette période, avec l'application de povidone iodée solution 10% (VETOQUINOL, Lure, France) et d'eau oxygénée sur leurs cicatrices. Si besoin, de la pommade Dermaflon® (Zoetis, Paris, France) est appliquée afin de faciliter la cicatrisation. Un suivi hebdomadaire de leur poids est également effectué.

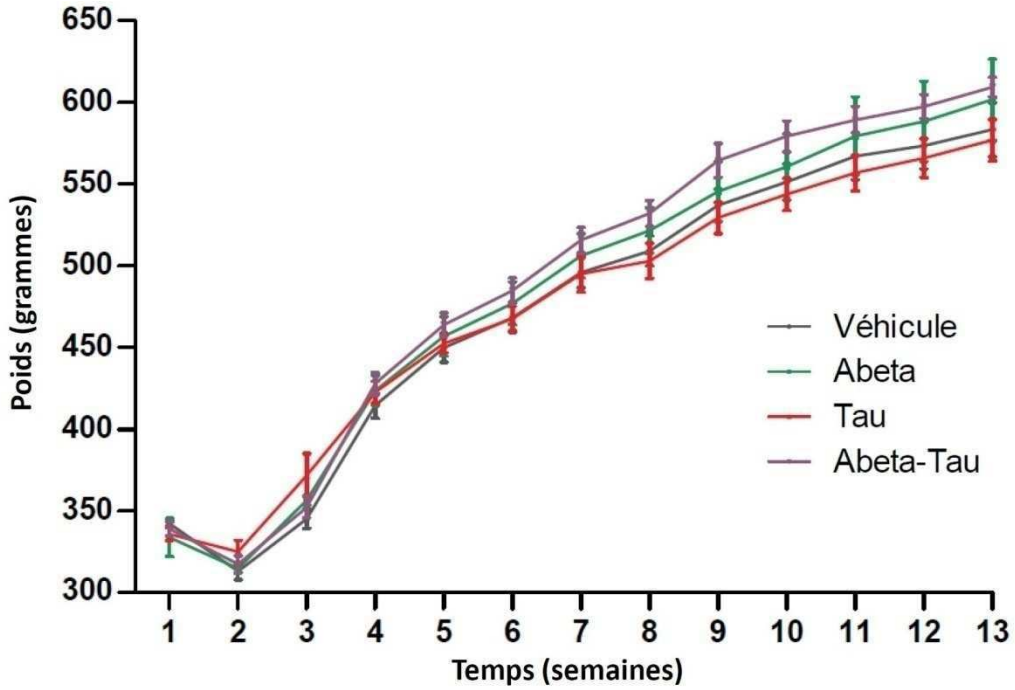
12.2.4. Enregistrements des EEG

Les enregistrements d'EEG sont réalisés directement au sein de l'animalerie. Ils sont déclenchés à distance par informatique, après avoir activé les radio-émetteurs à l'aide d'un aimant passé au niveau de l'abdomen des animaux. Les signaux d'EEG et d'activité locomotrice sont enregistrés en continu pendant une période minimale de 24 heures à l'aide d'une antenne positionnée sous chaque cage (RPC-1 bioreceiver, Data Sciences International, MN, USA). Les données individuelles sont collectées puis analysées par période de 10 secondes par le logiciel d'acquisition ART™ 4.2 (Data Sciences International, MN, USA).

12.2.5. Présentation et analyse des enregistrements d'EEG

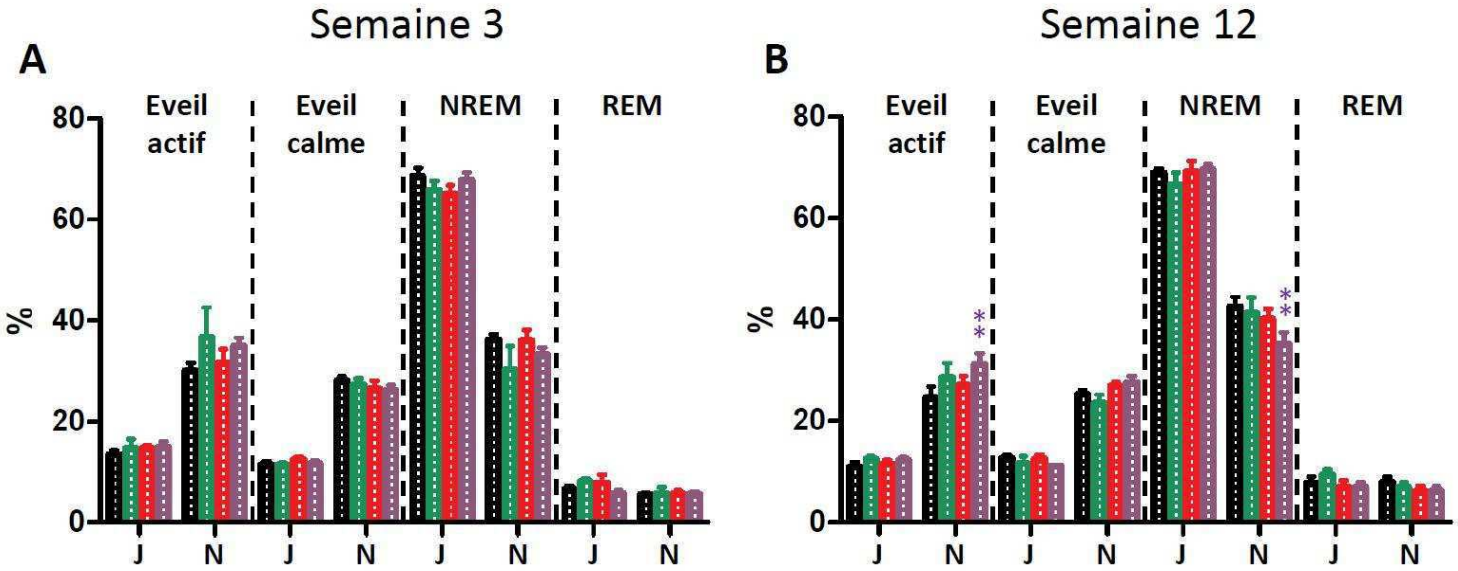
Une transformation de Fourier du signal d'EEG global est réalisée par le logiciel d'analyse ART™, afin de décomposer le signal obtenu en cinq types d'ondes cérébrales (voir chapitre 4.1) suivant une gamme de fréquence adaptée à l'espèce (Louis et al., 2004)(Grasing and Szeto, 1992) : δ : 1,5 à 6 Hz, θ : 6-10 Hz, α : 10,5 à 15 Hz, β : 22 à 30 Hz et γ : 35 à 45 Hz. Ces différents signaux sont ensuite analysés à l'aide d'un algorithme basé sur la publication de R.P. Louis (Louis et al., 2004), afin de déterminer, par période de 10 secondes, quatre différents états de chaque rat : éveil actif, éveil calme, sommeil paradoxal (REM) et sommeil non paradoxal (NREM). L'algorithme utilisé défini un état en fonction du franchissement ou non d'un seuil calculé à partir du ratio de la puissance de certaines ondes (exemple : ratio des ondes correspondant aux phases de sommeil sur les ondes correspondant aux phases d'activité, voir **figure 84**). La puissance d'une onde est définie comme la quantité d'une onde (en fonction de sa fréquence) sur une certaine période (ici, des périodes de 10 secondes sont utilisées) et est exprimée en mV.

Les effets de chaque traitement (Abeta, Tau et Abeta plus Tau) sur les cycles éveil/sommeil des animaux, ainsi que sur d'éventuelles modifications de la puissance des différentes ondes cérébrales, sont évalués. La puissance des différentes ondes cérébrales sont analysés en fonction de l'état des animaux (éveil actif, éveil calme, REM et NREM) et en fonction des cycles jour/nuit de 12 heures.



<u>Figure 85</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°4.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). Groupe Véhicule : N=7 ; Groupe Abeta : N=5 ; Groupe Tau : N=7 ; Groupe Abeta-Tau N=7.



<u>Figure 86</u> : Proportion des différents états de chaque groupe sur une période de 24 heures.

J : période diurne (7h30 à 19h30).

N : période nocturne (19h30 à 7h30).

La proportion de chaque état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) est exprimée sous la forme d'un pourcentage pour chaque groupe, en fonction du cycle jour/nuit et après trois semaines post-injection (**A**) ou 12 semaines post-injection (**B**). L'effet de chaque traitement sur ces paramètres est comparé aux résultats obtenus avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=7 ; Groupe Abeta : N=5 ; Groupe Tau : N=5 ; Groupe Abeta-Tau N=6.

Les cycles éveil/sommeil sont présentés sous forme de pourcentage moyen ± SEM de chaque état sur des périodes de 12 heures. Les puissances d'ondes de chaque groupe traité sont exprimées sous la forme de variation (%) par rapport au groupe Véhicule. Ces variations sont calculées à partir des moyennes de la puissance des ondes de chaque groupe sur des périodes de 12 heures.

Les résultats obtenus avec chaque groupe traité (groupe Abeta, Tau et Abeta-Tau) sont comparés aux résultats obtenus avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule.

Les effectifs d'animaux inclus dans l'analyse des EEG ne correspond pas aux effectifs de départ ou indiqués dans le graphique de l'évolution pondérale (**figure 85**), car nous avons rencontré plusieurs pannes d'émetteurs et un cas de désinstrumentation des électrodes.

12.3. Résultats

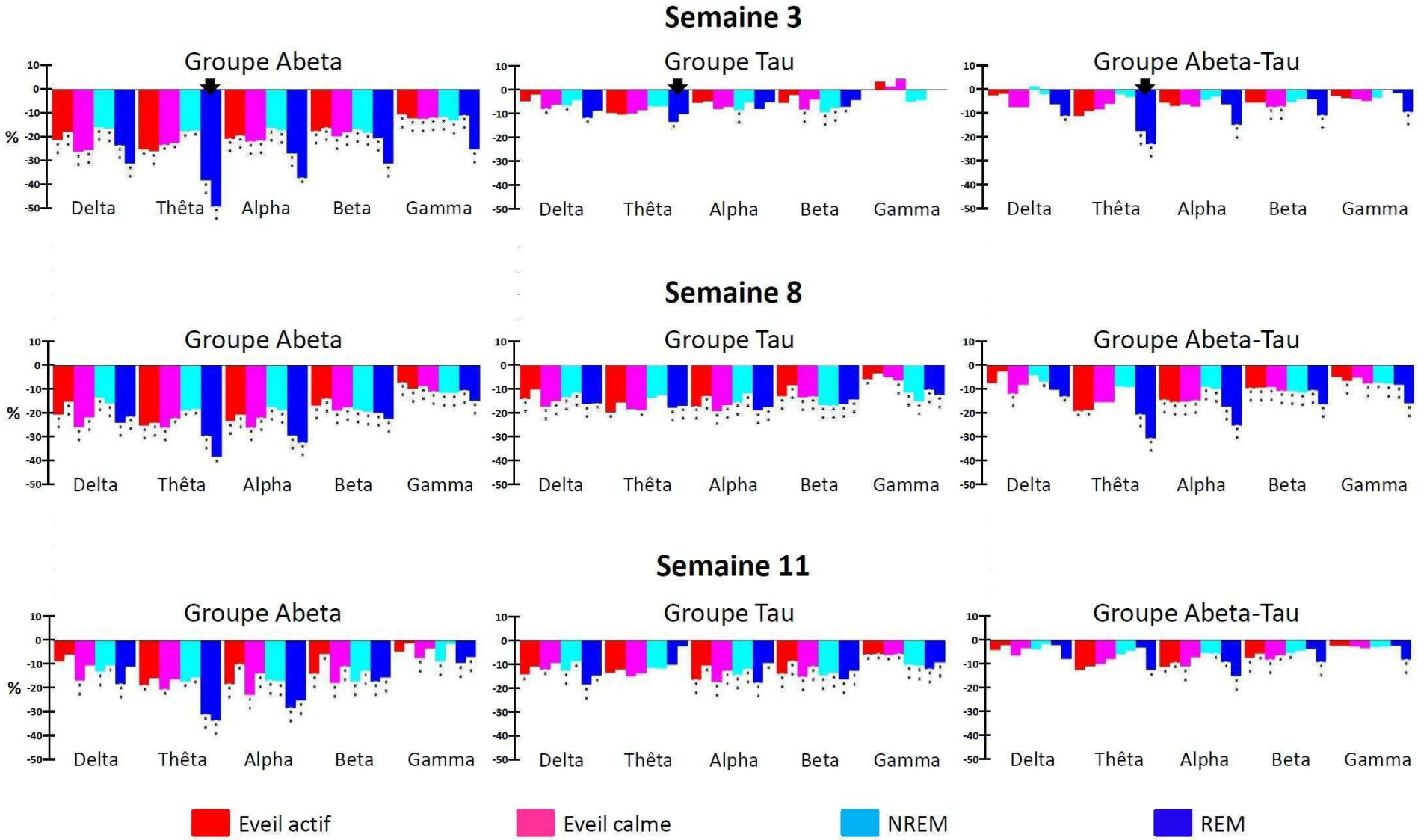
12.3.1. Suivi du poids

Les différents traitements n'ont pas induit de changement sur la prise de poids des animaux en comparaison avec les rats du groupe Véhicule (**figure 85**).

12.3.2. Analyse des enregistrements d'EEG

Analyse des cycles éveil/sommeil :

Seule une baisse du sommeil NREM est constatée lors de la période nocturne avec le groupe Abeta-Tau et lors de la dernière semaine d'enregistrement (12ème semaine post-injection : **figure 86 B**). Cette baisse de la proportion de NREM est en faveur d'une augmentation des phases d'éveil actif. Cependant, ce changement ne présente pas d'intérêt majeur car il concerne une augmentation d'activité lors de la période nocturne, or le rat est une espèce nocturne (actif la nuit). Aucun autre changement n'est constaté au niveau de la proportion des différents états et lors des autres semaines d'enregistrements d'EEG (seule la troisième semaine et la 12ème semaine sont présentées **figure 86**).



<u>Figure 87</u> : Effet des différents traitements sur la puissance des ondes cérébrales enregistrées par électroencéphalographie.

Delta (δ) : 1,5 à 6 Hz ; Thêta (θ) : 6-10 Hz ; Alpha (α) : 10,5 à 15 Hz ; Beta (β) : 22 à 30 Hz ; Gamma (γ) : 35 à 45 Hz.

La puissance de chaque onde cérébrale de chaque groupe traité est exprimée sous la forme d'un pourcentage de variation par rapport au groupe Véhicule sur une période de 24 heures lors de la troisième, huitième et 11ème semaine post-injection. Les analyses de chaque onde sont réalisées état par état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) et en fonction du cycle jour nuit (première barre : jour ; deuxième barre : nuit). Les résultats obtenus sont comparés à ceux du groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=7 ; Groupe Abeta : N=5 ; Groupe Tau : N=5 ; Groupe Abeta-Tau N=6.

Analyse de la puissance des ondes cérébrales :

La variation, en comparaison avec le groupe Véhicule, de la puissance des cinq ondes cérébrales, analysée état par état, est présentée dans la **figure 87**. Ces variations sont calculées à partir des valeurs obtenues heure par heure sur une période de 24 heures (exemple : **figure 88**). Seule trois semaines sont présentées car elles sont représentatives des autres résultats obtenus et car la semaine 8 et la semaine 11 correspondent à la première et à la dernière semaine enregistrée lors de l'expérience suivante (expérience n°5).

Une baisse globale de la quantité de chaque onde est constatée avec les trois différents traitements et lors de chaque semaine d'enregistrement. Cette baisse est plus marquée chez le groupe Abeta. Aucune évolution particulière n'est constatée avec les groupes Abeta et Abeta-Tau au fil des différentes semaines post-injection. Seuls les rats du groupe Tau semblent présenter une évolution dans le temps de leur activité cérébrale. En effet, la diminution du niveau de chacune de leurs cinq ondes cérébrales est plus importante lors des semaines 8 et 11 en comparaison avec la semaine 3 où peu de changement de l'activité électrique est enregistré.

Un autre point à relever est que la baisse de la puissance des différentes ondes est plus importante lors des phases de REM et concerne plus particulièrement l'onde θ chez les rats ayant reçu une injection de peptide Aβ (groupe Abeta et Abeta-Tau). Chez les rats du groupe Tau, le REM et l'onde θ ne sont pas plus impactés que les autres états et les autres ondes cérébrales.

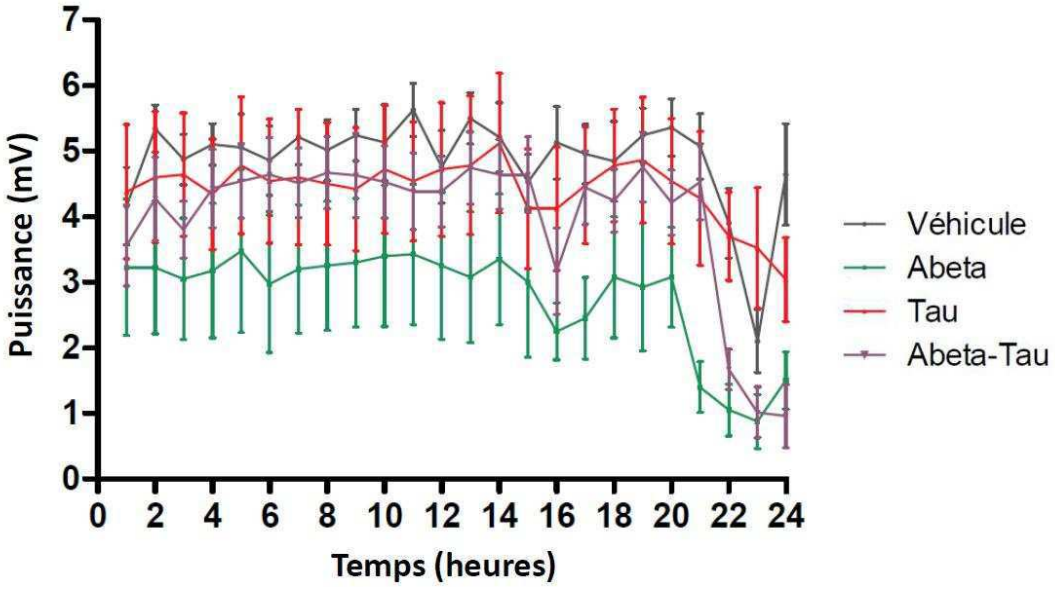
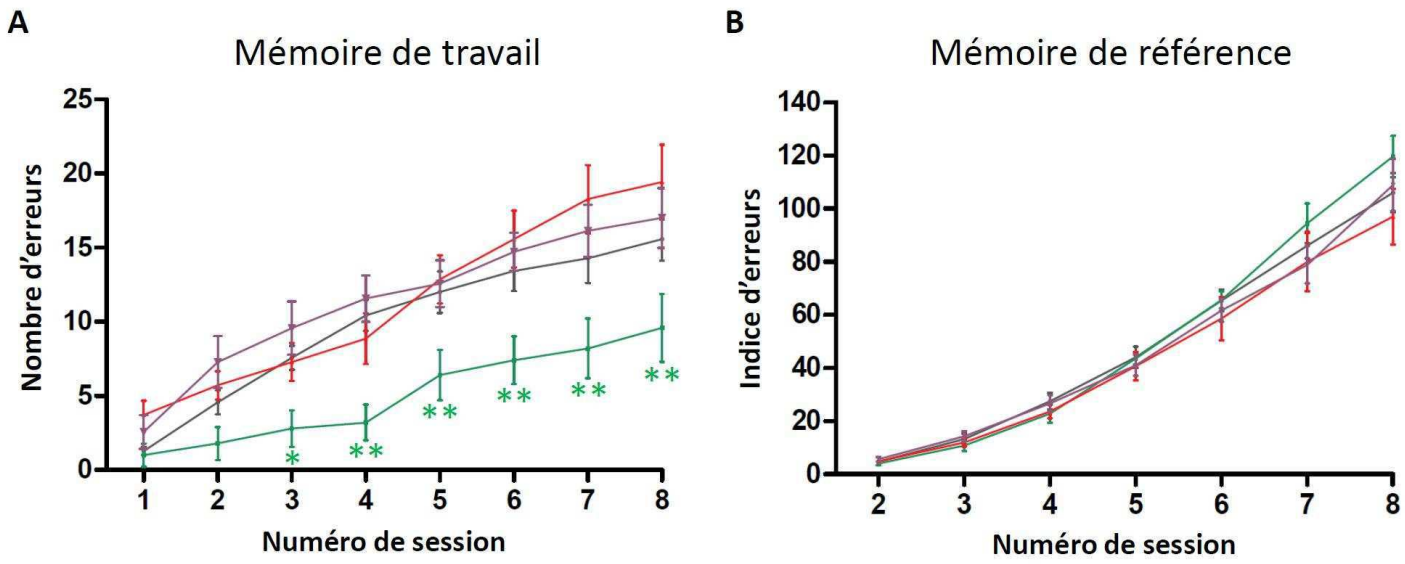


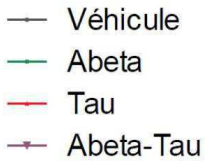
Figure 88 : Puissance de l'onde θ obtenue pendant les phases de REM lors de la troisième semaine post-injection.

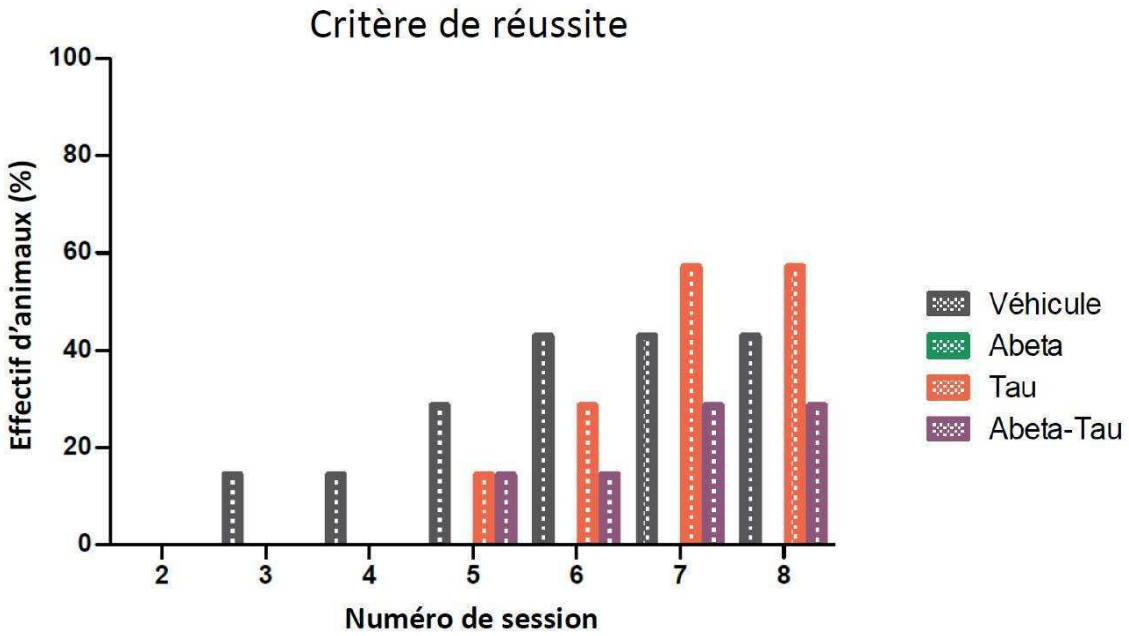
La puissance de l'onde θ est présentée sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe et heure par heure, sur une période de 24 heures. Ces résultats sont utilisés pour le calcul de la variation de la puissance de l'onde par rapport au groupe Véhicule (fléches noires dans la **figure 87**).



<u>Figure 89</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire.

Seuls les paramètres de mémoire de travail (**A**) et de mémoire de référence (**B**) sont analysés. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=7 ; Groupe Abeta : N=5 ; Groupe Tau : N=7 ; Groupe Abeta-Tau N=7.





<u>Figure 90</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve, lors d'une session, les trois plateformes en comettant un maximum d'une erreur de mémoire de référence. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. Groupe Véhicule : N=7 ; Groupe Abeta : N=5 ; Groupe Tau : N=7 ; Groupe Abeta-Tau N=7.

12.3.3. Evaluation de la mémoire

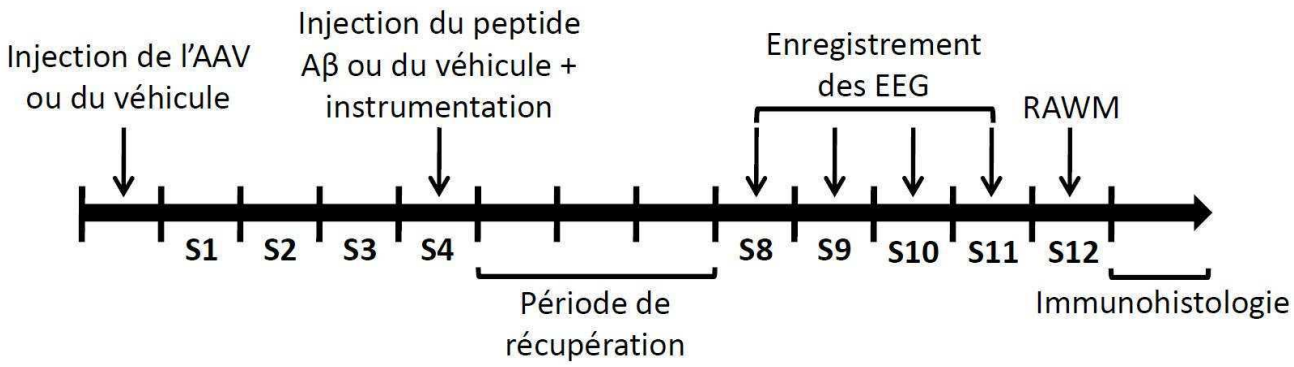
Les trois différents traitements (Abeta, Tau et Abeta-Tau) n'ont induit aucune augmentation des erreurs de type mémoire de travail ou mémoire de référence en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 89**). Une baisse significative du nombre d'erreurs de type mémoire de travail est néanmoins observée chez les animaux du groupe Abeta (**figure 89 A**). Nous ne considérons pas cet effet comme une amélioration des capacités mnésiques des rats du groupe Abeta car une altération de la mémoire a précédemment été décrite (expérience n°3) sur un effectif important de rats ayant subit les mêmes types d'injections intracérébrales. De plus, aucun rat du groupe Abeta ne sort positif au critère de réussite (**figure 90**). Les effectifs de rats des autres groupes, sortant positifs à ce critère, sont d'ailleurs relativement faibles au regard des études précédentes.

12.4. Discussion

L'analyse des EEG nous a permis de quantifier et de suivre dans le temps, un effet induit par les différents traitements, sur une série d'animaux chez lesquels nous n'avons pas pu identifier un effet mémoire. Le principal effet observé à l'aide des enregistrements d'EEG est une baisse de l'activité électrique globale du cerveau (baisse de la puissance des ondes cérébrales). Nous attribuons cette baisse à un dysfonctionnement du réseau cérébral induit par les différentes lésions : dépôts de peptide Aβ et inclusions intracellulaires de la protéine Tau phosphorylée. En revanche, aucune perturbation des cycles éveil/sommeil ni de modification notoire de l'architecture du sommeil n'ont été induit par ces lésions, ce qui conforte notre hypothèse que notre modèle de MA est plus représentatif d'un stade précoce. Chez l'Homme, les perturbations du sommeil sont rencontrées lors de phases avancées de la MA et seraient liées à une atteinte de l'hypothalamus (voir chapitre 4.2). Chez des modèles animaux de la MA, ces types de perturbations sont décrites seulement sur des animaux transgéniques, donc avec une atteinte plus large du cerveau et non limitée à l'hippocampe comme dans notre modèle.

L'analyse des EEG nous a également permis de mettre en évidence des différences d'effets induits par le peptide Aβ42 et par le vecteur AAV-Tau : la baisse de l'activité électrique cérébrale s'amplifie au fil des semaines avec les rats du groupe Tau, alors que les rats ayant reçu une injection de peptide Aβ ne montrent pas d'évolution de ce paramètre. Contrairement aux rats du groupe Tau, les animaux traités avec le peptide Aβ présentent une diminution de l'activité cérébrale plus particulièrement marquée pendant les phases de REM, avec une baisse plus importante de la puissance de l'onde θ. Des effets sur le REM ainsi qu'une baisse de la puissance de l'onde θ, ont déjà été décrits chez l'Homme ou sur des modèles animaux de MA exprimant le peptide Aβ ou après une injection intrahippocampique de peptide Abeta (voir chapitre 4.2 et 4.3). Nos résultats concernant les rats traités avec le peptide Aβ sont donc cohérents avec ce qui est décrit dans la littérature, l'effet d'une tauopathie seule n'ayant jamais été étudiée. Les deux types de lésions : dépôts de peptide Aβ et inclusions de protéine Tau phosphorylée, induiraient donc des perturbations du fonctionnement de l'hippocampe suivant des mécanismes différents.

En revanche, nous avons été surpris de ne pas observer d'effet additionnel sur la baisse de la puissance des ondes cérébrales avec l'injection concomitante du peptide Aβ et du vecteur AAV-Tau.



<u>Figure 91</u> : Schéma du plan expérimental de l'expérience n°5.

S : Semaine post-injection.

Une des hypothèses avancée est que l'injection du peptide Aβ42 ne constitue pas un milieu favorable, notamment en raison des phénomènes pro-inflammatoires aigüs et de la neurotoxicité (voir chapitre 1), pour la transfection de cellules par un vecteur viral et pour l'expression d'une protéine.

13. Expérience n°5

13.1. Introduction

Une nouvelle expérience a été entreprise afin de confirmer sur une autre série d'animaux, les effets observés sur la baisse de l'activité électrique cérébrale et plus particulièrement sur la diminution de la puissance de l'onde θ pendant les phases de REM, et afin de tester l'hypothèse qu'une injection de peptide Aβ « freinerait » l'effet induit par l'injection du vecteur AAV -Tau P301L. Pour cela, nous avons choisi de réaliser la double injection intrahippocampique lors de deux chirurgies distinctes et espacées de quatre semaines. Dans cette nouvelle étude, le vecteur AAV-Tau est ainsi injecté en premier, suivi du peptide Aβ. Ces injections décalées permettent également de se rapprocher de l'hypothèse alternative à la cascade amyloïde (voir chapitre 1.3.3.1) où la MA serait déclenchée suite à une surcharge amyloïde au niveau d'une région du cerveau déjà vulnérabilisée par une dégénérescence neurofibrillaire, pouvant être retrouvée notamment au niveau de l'hippocampe chez les personnes âgées.

13.2. Matériels et méthodes

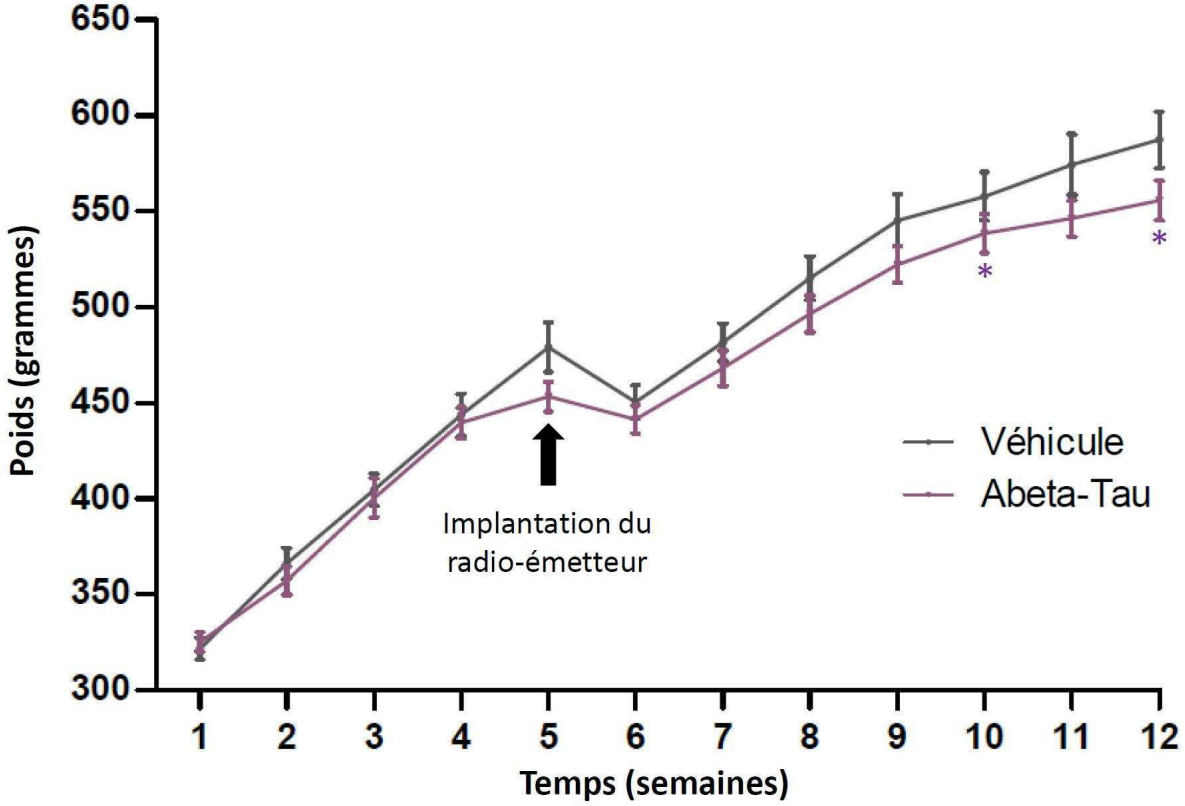
Procédure expérimentale :

Des rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France) de 300g environ sont divisés en deux groupes :

- **Groupe Véhicule :** 10 rats ayant reçu deux injections intrahippocampiques bilatérales séparées de quatre semaines d'une solution de Ringer lactate (Lavoisier, Paris, France).
- **Groupe Abeta-Tau :** huit rats ayant reçu une injection intrahippocampique bilatérale de 4 µL d'une solution contenant 2,1 $.10^9$ particules de vecteur AAV-Tau P301L (Pr. R.L. Klein, University of Shreveport, Louisiane, USA) puis de 4 µL d'une solution contenant 2 nmol de peptide Aβ 1-42 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) non agrégé, quatre semaines après l'injection de l'AAV-Tau.

Les animaux sont instrumentés avec le radio-émetteur et les électrodes lors de la deuxième injection réalisée quatre semaines après la première injection (**figure 91**). Les coordonnées stéréotaxiques utilisées sont les mêmes que celles utilisées précédemment, excepté pour la deuxième injection où une correction de - 0,3 mm est appliquée à la coordonnée de profondeur : **P - 4,8 mm**. Cette correction a été déterminée suite à des tests de validation des coordonnées par injection d'une solution de Bleu Evans. Elle correspond à un épaississement de l'os pariétal avec l'âge.

Les enregistrements d'EEG sont réalisés après une période de récupération de trois semaines après la deuxième injection. L'évaluation de la mémoire se fait la 12ème semaine après la première injection avec la procédure de RAWM à trois positions de plateforme.



<u>Figure 92</u> : Suivi de l'évolution pondérale des animaux de l'expérience n°5.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. L'effet de chaque traitement sur la prise de poids est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0{,}05$). *: $P \leq 0.05$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=10 ; Groupe Abeta-Tau N=8.

Les animaux sont sacrifiés lors de la semaine suivant le test du RAWM, afin de procéder à l'évaluation des lésions histologiques par technique d'immunofluorescence. Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence sont présentés dans le tableau suivant :

Anticorps	Clone ou fluorochrome	Classe	Espèce hôte	Cible	Dilution	Fournisseur
Primaires	/ (anti-Tau P S422)	Polyclonal	Lapin	Phosphate sur Ser 422 (anti-PHF)	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	PHF1	Monoclonal	Souris	Phosphate sur Ser 396 et 404 de Tau	1/100	Dr. Peter Davies, Hofstra North Shore-LIJ School of Medicine, NY , USA
	WO2	Monoclonal	Souris	AA 4-10 du peptide humain Aβ	1/100	Merck Millipore, Molsheim, France
	/ (anti-GFAP)	Polyclonal	Lapin	Protéine GFAP des astrocytes	1/100	Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France
	/ (anti-Iba1)	Polyclonal	Chèvre	AA 135-147 de la protéine humaine Iba1 des macrophages	1/100	Abcam Cambridge, Royaume-Uni
Secondaires	Alexa-488	Polyclonal	Ane	Ig de souris	1/50	Jackson Immuno Research, Villepinte, France
	RRX			Ig de souris		
	RRX			Ig de lapin		
	RRX			Ig de chèvre		

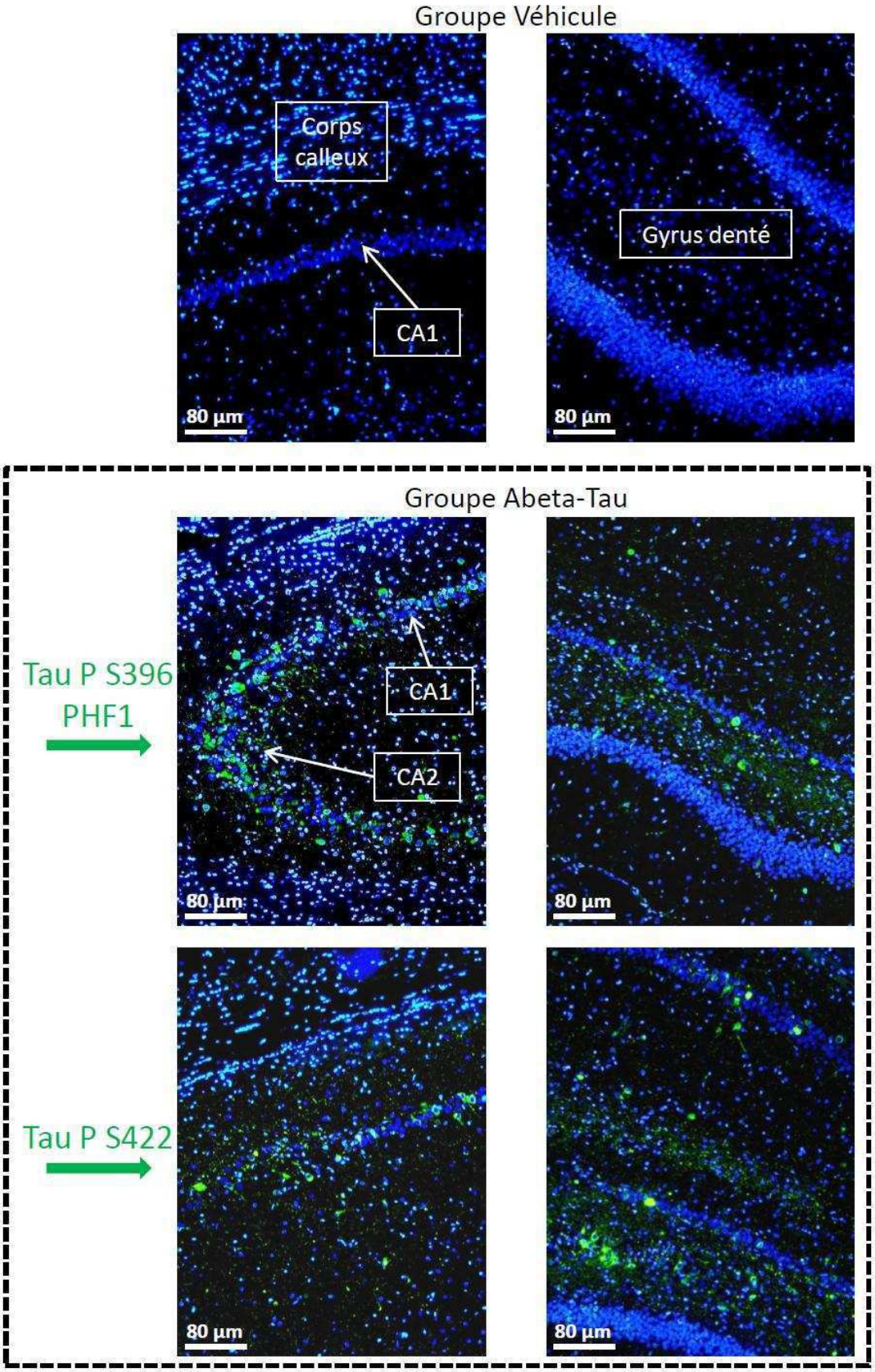
<u>Tableau 13</u> : Listes des différents anticorps utilisés pour l'immunohistologie lors de l'expérience n°5.

Ser : sérine

13.3. Résultats

13.3.1. Suivi du poids

L'injection de vecteur AAV-Tau et du peptide Aβ42 a induit une prise de poids moins rapide en comparaison avec les rats du groupe Véhicule (**figure 92**). L'écart de poids observé entre le groupe Véhicule et le groupe Abeta-Tau est significatif lors de la semaine n°9 et n°11. De plus, une perte de poids est observée suite à la deuxième injection intracérébrale qui correspond également à l'instrumentation des animaux.



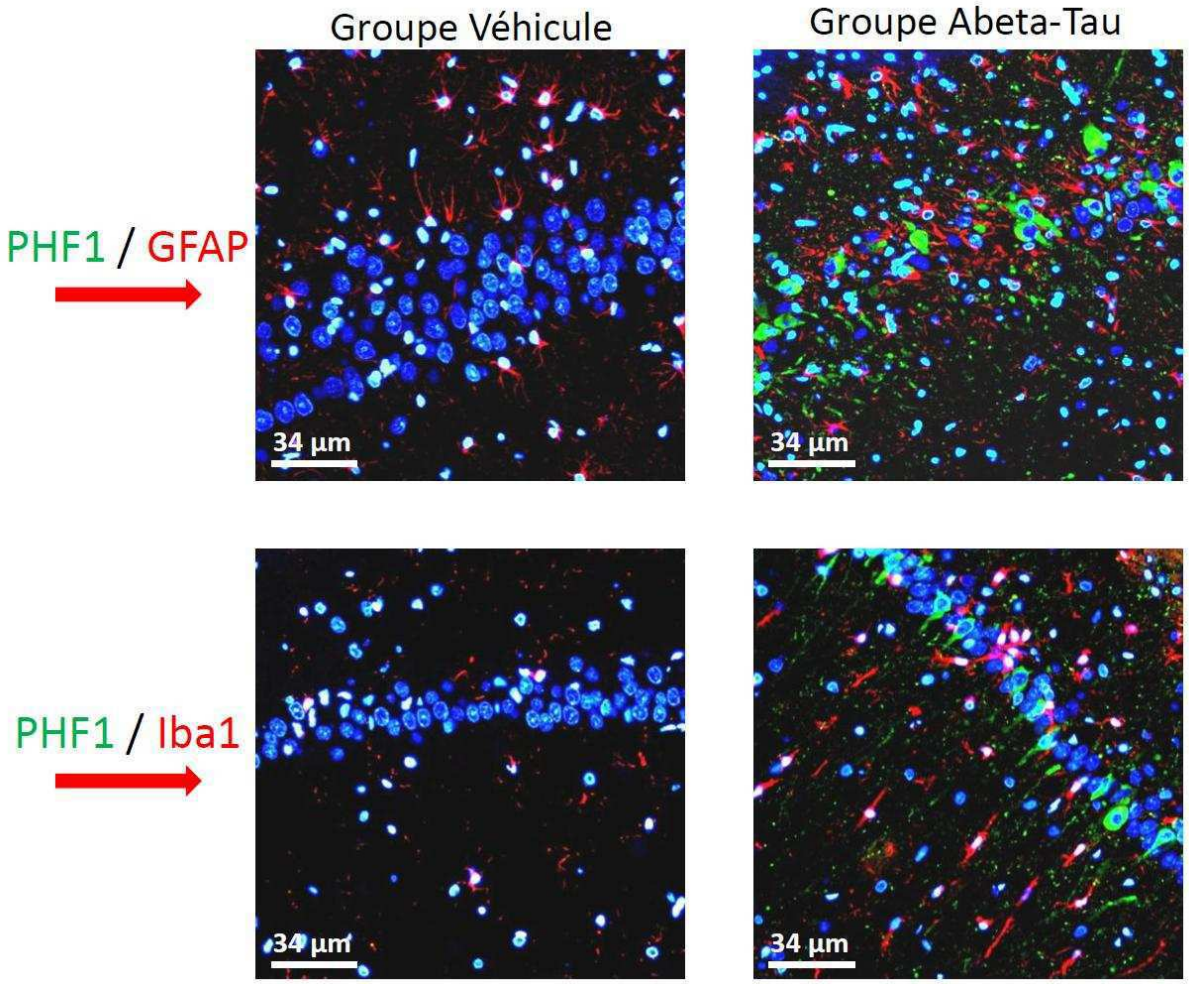
<u>Figure 93</u> : Marquage de la protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée dans les différentes couches de l'hippocampe.

La présence de marquages de la protéine Tau phoshorylée (anticorps PHF1, en vert) et anormalement phosphorylée (anticorps anti-Tau P S422, en vert) est observée au niveau des différentes couches de l'hippocampe : CA1, CA2, et gyrus denté.

13.3.2. Evaluation des lésions histologiques

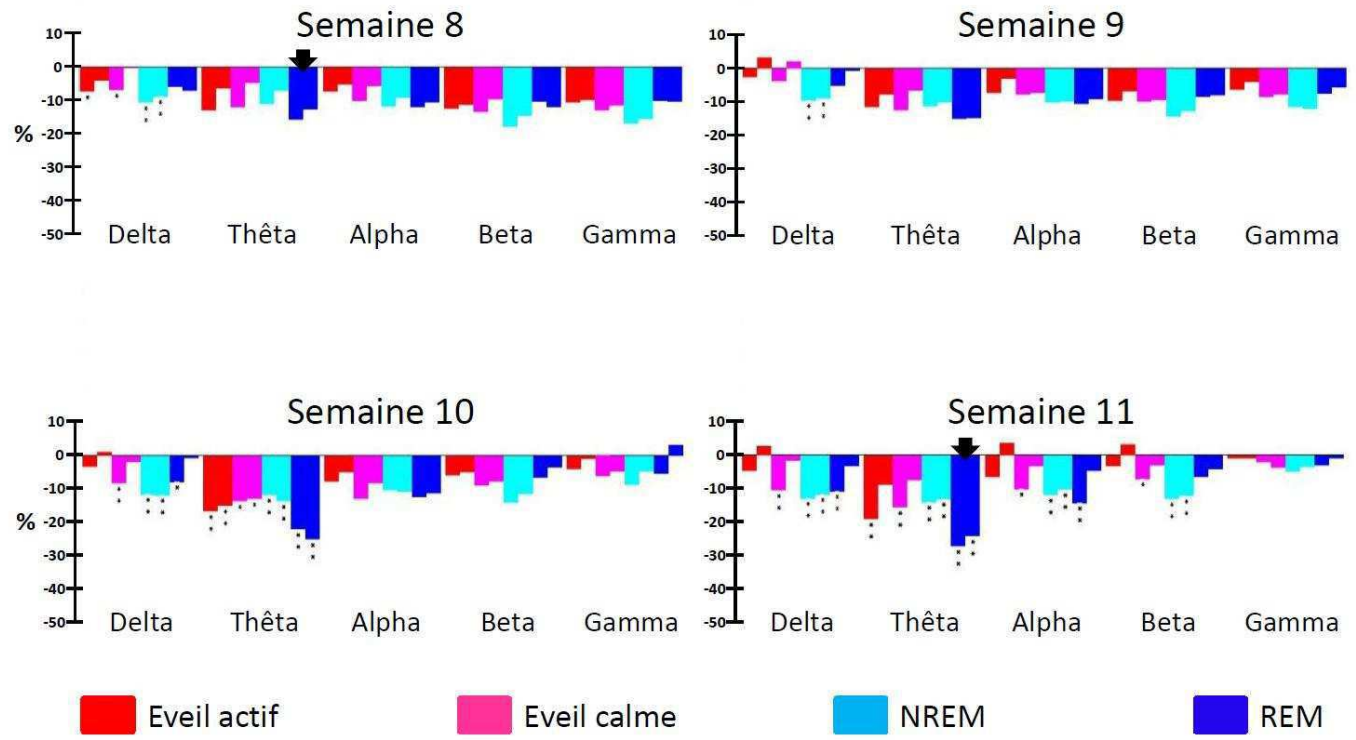
Des inclusions de la protéine Tau phosphorylée et anormalement phosphorylée sont observées chez les rats du groupe Abeta-Tau, au niveau des différentes couches neuronales de l'hippocampe (**figure 93**). Pour la première fois, nous avons constaté la présence de ces inclusions dans la couche CA2, chez des rats ayant reçu à la fois le peptide Aβ42 et le vecteur AAV-Tau. Ces lésions de type neurofibrillaire sont accompagnées d'une réaction gliale localisée (**figure 94**) avec la présence d'astrocytes hyperactivés (marquage GFAP) et de cellules microgliales réactives (marquage Iba1).

Aucun dépôt de peptide Aβ n'a été observé sur cette série de rats.



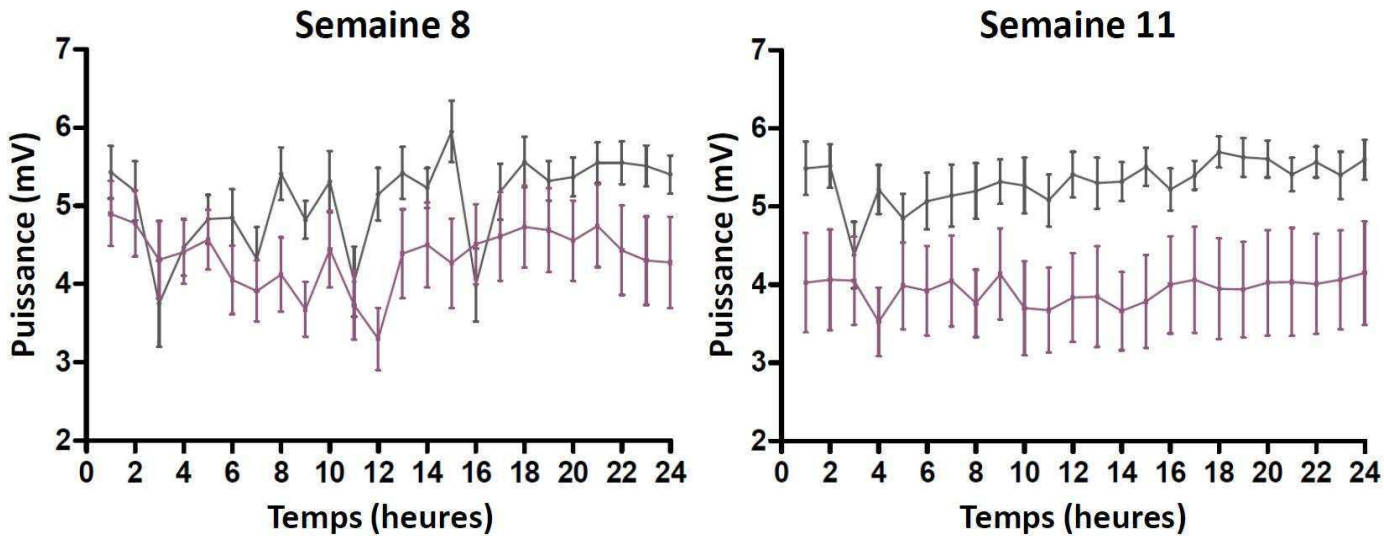
<u>Figure 94</u> : Réaction gliale à proximité des lésions de type neurofibrillaire au niveau de la couche CA1.

Les inclusions de protéines Tau phosphorylées (anticorps PHF1, en vert) sont associées à une réaction astrocytaire (anticorps anti-GFAP, en rouge) et microgliale (anticorps anti-Iba1, en rouge).



<u>Figure 95</u> : Effet du traitement Abeta-Tau sur la puissance des ondes cérébrales.

Delta (δ) : 1,5 à 6 Hz ; Thêta (θ) : 6-10 Hz ; Alpha (α) : 10,5 à 15 Hz ; Beta (β) : 22 à 30 Hz ; Gamma (γ) : 35 à 45 Hz. La puissance de chaque onde cérébrale du groupe Abeta-Tau est exprimée sous la forme d'un pourcentage de variation par rapport au groupe Véhicule sur une période de 24 heures, lors des quatre semaines d'enregistrements des EEG. Les analyses de chaque onde sont réalisées état par état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) et en fonction du cycle jour nuit (première barre : jour ; deuxième barre : nuit).). Les résultats obtenus sont comparés à ceux du groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au groupe Véhicule. Groupe Véhicule : N=10 ; Groupe Abeta-Tau : N=8.

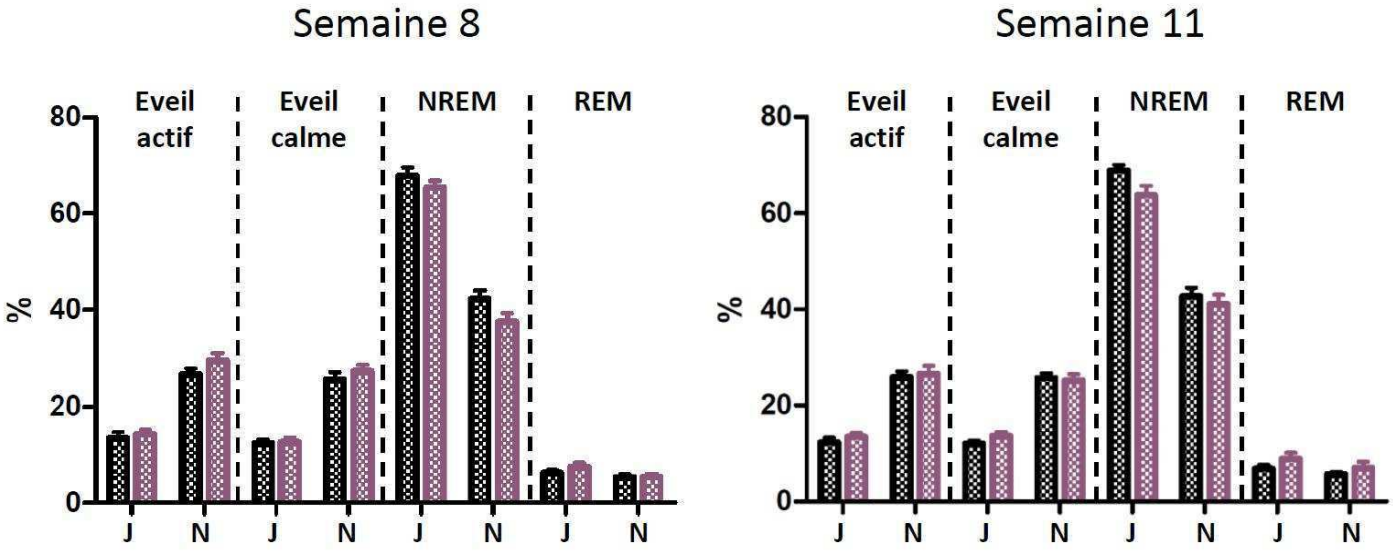


<u>Figure 96</u> : Puissance de l'onde θ obtenue pendant les phases de REM lors de la première et de la dernière semaine d'enregistrement.

La puissance de l'onde θ est présentée sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe et heure par heure, sur une période de 24 heures. Ces résultats sont utilisés pour le calcul de la variation de la puissance de l'onde par rapport au groupe Véhicule (fléches noires dans la **figure 95**).

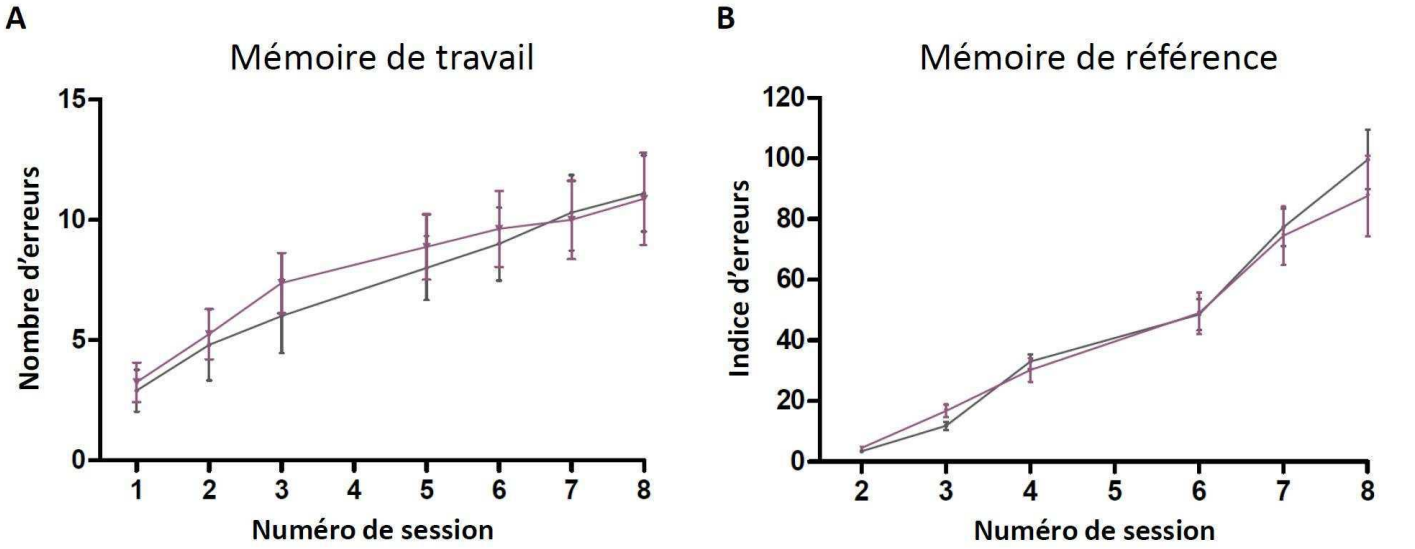
13.3.3. Analyse des enregistrements d'EEG

De la même manière que dans l'étude précédente, aucun changement des cycles éveil/sommeil ou de la proportion de REM et de NREM n'a été constaté avec les rats du groupe Abeta-Tau en comparaison avec le groupe Véhicule (**figure 97**). Seule une baisse globale de la quantité des différentes ondes cérébrales est induite par l'injection du vecteur AAV-Tau et du peptide Aβ (**figure 95**). Lors des semaines n°8 et 9, l'effet sur la baisse des puissances d'ondes semble moins important qu'avec le groupe Abeta-Tau après huit semaines post-injection lors de l'expérience précédente (**figure 87**). En revanche, contrairement au groupe Abeta-Tau de l'expérience précédente, une amplification de ce phénomène est constatée au fil des semaines et particulièrement avec l'onde θ pendant les phases de REM (**figure 95 et 96**). Lors de la dernière semaine d'enregistrement (semaine 11), une diminution d'environ 30% de la puissance de l'onde θ est enregistrée chez les rats du groupe Abeta-Tau pendant leurs phases de REM en comparaison avec les rats du groupe Véhicule (**figure 95**). Cette proportion de baisse est plus importante qu'avec le groupe Abeta-Tau de l'expérience précédente après 11 semaines post-injection (**figure 87**), et correspond au niveau de baisse rencontrée chez les rats ayant reçu une injection seule de peptide Aβ42.



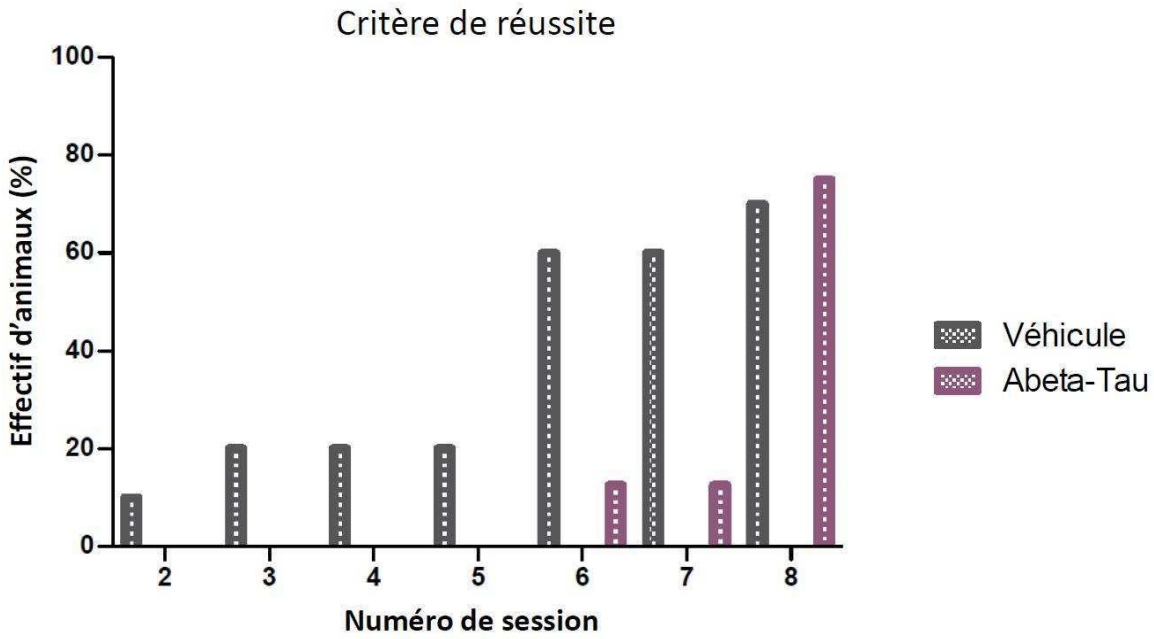
<u>Figure 97</u> : Proportion des différents états de chaque groupe sur une période de 24 heures.

J : période diurne (7h30 à 19h30).
N : période nocturne (19h30 à 7h30).
La proportion de chaque état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) est exprimée sous la forme d'un pourcentage pour chaque groupe, en fonction du cycle jour/nuit et après huit semaines post-injection (**A**) ou 11 semaines post-injection (**B**). L'effet de chaque traitement sur ces paramètres est comparé aux résultats obtenus avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Groupe Véhicule : N=10 ; Groupe Abeta-Tau : N=8.



<u>Figure 98</u> : Résultats du test d'évaluation de la mémoire.

Seuls les paramètres de mémoire de travail (**A**) et de mémoire de référence (**B**) sont analysés. Les résultats de chaque animal sont cumulés session par session et sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM pour chaque groupe. L'effet de chaque traitement est comparé avec le groupe Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* de Dunnett en cas de significativité ($P \leq 0,05$). Groupe Véhicule : N=10 ; Groupe Abeta-Tau : N=8.



<u>Figure 99</u> : Effectif des rats de chaque groupe sortant positif au critère de réussite de la phase d'apprentissage.

Un animal sort positif à ce critère lorsqu'il trouve, lors d'une session, les trois plateformes en comettant un maximum d'une erreur de mémoire de référence. L'effectif de rats de chaque groupe sortant positifs à ce critère est comparé, session par session, à celui du groupe Véhicule à l'aide du test de Fisher. Groupe Véhicule : N=10 ; Groupe Abeta-Tau : N=8.

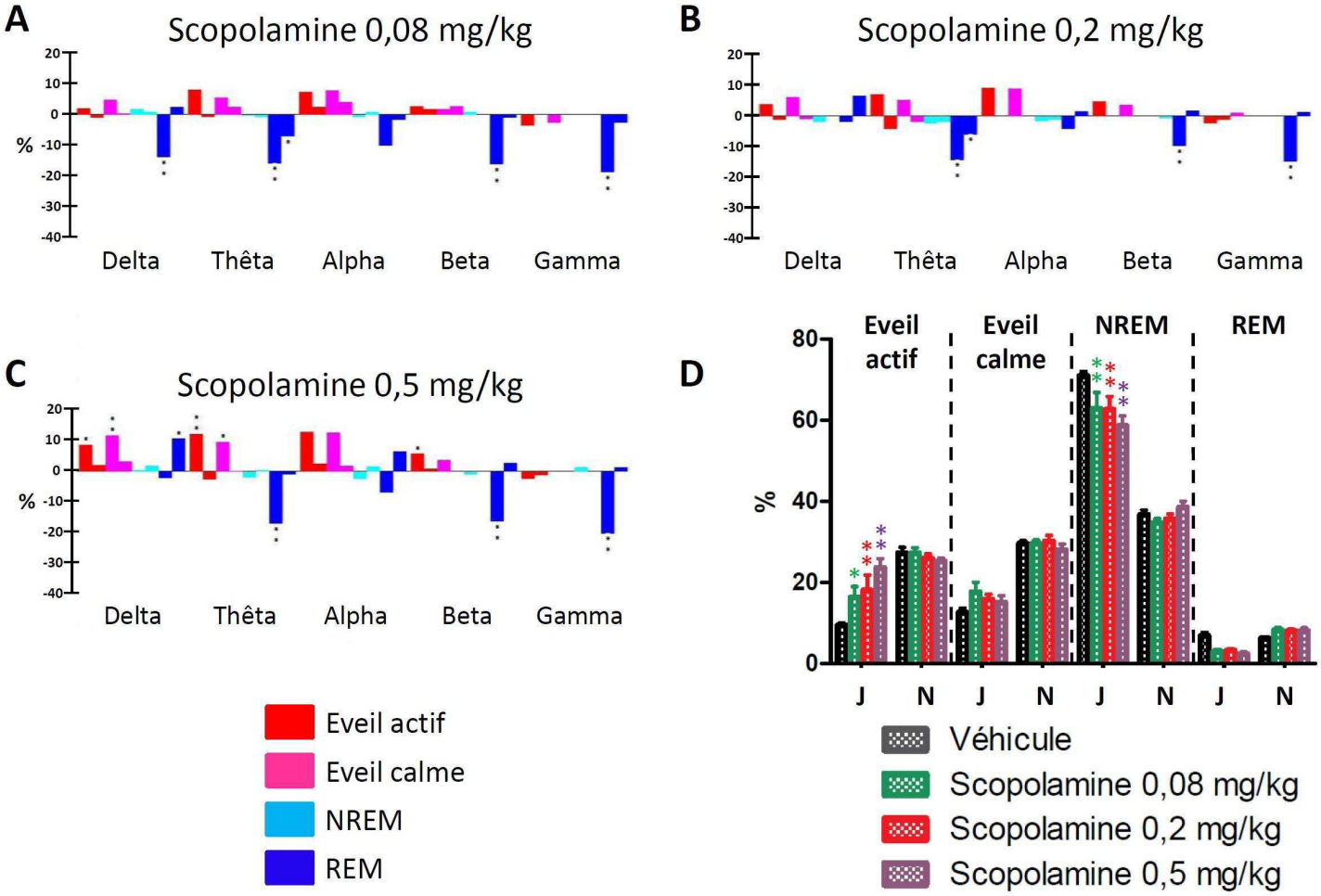
13.3.4. Evaluation de la mémoire

L'injection du vecteur AAV-Tau P301L suivie d'une injection de peptide Aβ42 quatre semaines après, n'ont induit aucun effet sur les paramètres de mémoire de travail et de mémoire de référence (**figure 98**). Seul le critère de réussite nous a permis d'observer une tendance à une baisse du nombre de rats sortant positifs au critère chez le groupe Abeta-Tau (**figure 99**), mais cette tendance n'est pas retrouvée au niveau de la dernière session d'apprentissage. De plus, comme ce critère est associé à la mémoire de référence et que nous n'avons pas constaté d'effet au niveau de ce paramètre, nous ne pouvons pas conclure à une baisse de la capacité d'apprentissage chez les rats du groupe Abeta-Tau.

13.4. Discussion

Le fait de décaler l'injection du peptide Abeta de quatre semaines, a permis d'obtenir un meilleur marquage immunohistologique des inclusions de la protéine Tau phosphorylée. L'effet observé sur les ondes cérébrales et en particulier sur la baisse de la puissance de l'onde θ pendant le REM, s'est fait de manière progressive et plus importante que lors de l'injection simultanée des deux substances. Ce dernier modèle semble donc se rapprocher un peu plus de la MA humaine. En revanche et comme dans l'étude précédente, nous n'avons pas décelé d'altération de la mémoire avec notre procédure de RAWM. Nous émettons l'hypothèse que l'instrumentation des animaux avec le système d'enregistrement des EEG n'est pas compatible avec un test d'évaluation de la mémoire dans un test de navigation spatial. Une des raisons qui pourrait-être invoquée, est un problème d'enrichissement du milieu pouvant entrainer une perte de motivation des animaux à chercher la plateforme. En effet, dans ces études d'analyse des EEG, les animaux sont hébergés de manière individuelle, contrairement aux expériences précédentes où les animaux étaient hébergés par groupe de trois ou quatre. Ce phénomène est essentiellement suspecté chez les animaux de l'expérience n°4 car ils ont reçu les mêmes traitements que les animaux de l'expérience n°3 où une altération de la mémoire a été constatée, et car très peu de rats, même chez le groupe Véhicule, sont sortis positifs au critère de réussite au test. Dans cette dernière expérience, au vu de la progressivité des effets observés sur les EEG ainsi que le fait que le peptide Aβ n'est été étudié que pendant huit semaines après injection, une altération de la mémoire pourrait intervenir plus tardivement.

Cette expérience a également permis de confirmer un phénomène inattendu : l'injection du vecteur AAV-Tau semble avoir limité l'action du peptide Aβ42 sur la baisse de la puissance des ondes θ. Lors de l'expérience n°4, les rats du groupe Abeta-Tau ont présenté des changements similaires à ceux du groupe Abeta, mais dans une moindre mesure. Dans cette dernière expérience où le vecteur AAV-Tau a été injecté quatre semaines avant le peptide Aβ42, donc avec un niveau d'expression plus élevé de la protéine Tau humaine au moment de l'injection du peptide Aβ, les effets sur la baisse des ondes ont été encore moins marqués en comparaison avec les effets rencontrés chez le groupe Abeta-Tau de l'expérience n°4 et lors des premières semaines d'enregistrements.



<u>Figure 100</u> : Effet de la scopolamine sur la puissance des ondes cérébrales ainsi que sur la proportion des différents états.

Delta (δ) : 1,5 à 6 Hz ; Thêta (θ) : 6-10 Hz ; Alpha (α) : 10,5 à 15 Hz ; Beta (β) : 22 à 30 Hz ; Gamma (γ) : 35 à 45 Hz.
A, **B** et **C** : Variation de la puissance des différentes ondes cérébrales en fonction de la dose de scopolamine administrée : **A** : 0,08 mg/kg ; **B** : 0,2 mg/kg ; **C** : 0,5 mg/kg. La puissance de chaque onde cérébrale est exprimée sous la forme d'un pourcentage de variation par rapport aux résultats obtenus avec l'injection de NaCl 0,9%, sur une période de 24 heures. Les analyses de chaque onde sont réalisées état par état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) et en fonction du cycle jour nuit (première barre : jour ; deuxième barre : nuit).

D : Proportion des différents états obtenue après injection de chaque dose de scopolamine. La proportion de chaque état (éveil actif, éveil calme, NREM et REM) est exprimé sous la forme d'un pourcentage pour chaque dose testée, en fonction du cycle jour/nuit.

Les résultats obtenus avec chaque dose sont comparés à ceux du traitement Véhicule à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées, suivie du test *post-hoc* LSD (Least Square Difference) en cas de significativité ($P \leq 0,05$). *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$ par comparaison au traitement Véhicule. N=7 pour chaque traitement.

14. Etude de l'effet d'un inhibiteur cholinergique sur les EEG

14.1. Introduction

En parallèle des expériences n°4 et 5, nous avons également testé les effets sur les EEG induits par notre substance de référence utilisée pour développer les tests de mémoire : la scopolamine. Nous avons choisi de tester les doses utilisées lors de la mise au point du test de RAWM à trois positions de plateforme, ainsi qu'une dose plus faible car nous nous attendons à ce que des changements de l'activité cérébrale interviennent avant les altérations de la mémoire.

14.2. Matériels et méthodes

Sept rats males Sprague Dawley (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France), préalablement instrumentés avec le système d'enregistrement des EEG, sont utilisés dans cette expérience. Après une période de récupération de trois semaines, les animaux sont traités par voie intrapéritonéale avec une injection de 1 mL/kg d'une solution de NaCl à 0,9% (Cooper, Melun, France). Les enregistrements d'EEG sont réalisés à la suite des l'injections et pour une période de 24 heures. Lors des semaines suivantes, trois doses d'une solution de scopolamine (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) reconstituée dans la solution de NaCl à 0,9%, sont testées de manière croissante et sur les mêmes animaux. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus après l'injection de la solution saline (NaCl 0,9%.)

- **Semaine 1 :** injection intrapéritonéale de NaCl 0,9% (**Véhicule**)
- **Semaine 2 :** injection intrapéritonéale de 0,08 mg/kg d'une solution de scopolamine (**scopolamine 0,08**).
- **Semaine 3 :** injection intrapéritonéale de 0,2 mg/kg d'une solution de scopolamine (**scopolamine 0,2**).
- **Semaine 4 :** injection intrapéritonéale de 0,5 mg/kg d'une solution de scopolamine (**scopolamine 0,5**).

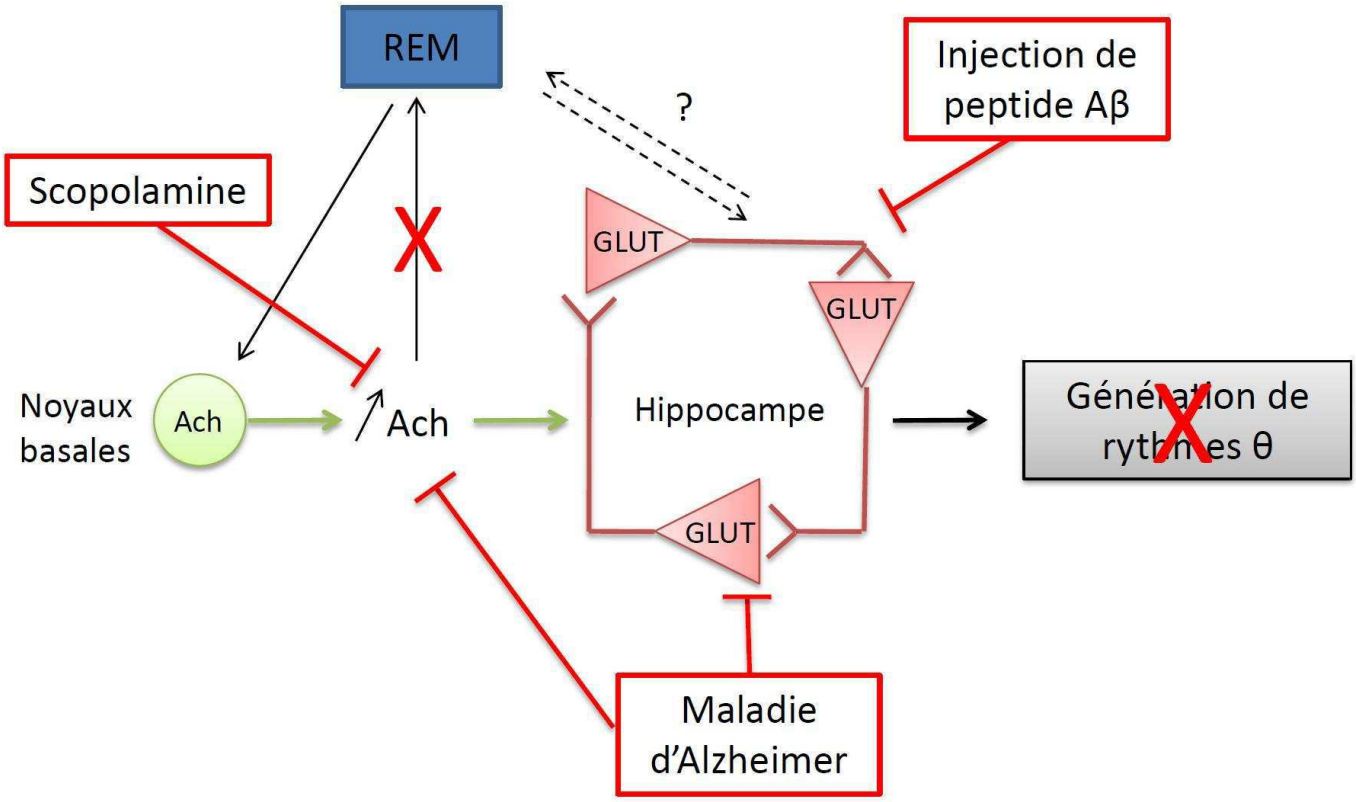
14.3. Résultats

Analyse des cycles éveil/sommeil :

L'injection de scopolamine aux trois différentes doses, induit une baisse significative du sommeil NREM pendant la phase diurne (**figure 100 D**). Une tendance à la baisse du sommeil REM durant la période diurne est également observée après injection de la scopolamine : la proportion de REM est de 6,9% après injection de la solution saline (Véhicule), contre 3%, 3,3% et 2,4% après injection de scopolamine dans l'ordre croissant des doses. Cette diminution de la proportion des phases de sommeil se fait en faveur d'une augmentation de la proportion d'éveil actif chez les animaux.

Analyse de la puissance des ondes cérébrales :

Différents effets sont constatés sur la puissance des ondes cérébrales dans les différents états et suivant la dose de scopolamine (**figure 100**), mais l'effet le plus marqué et commun aux trois différentes doses est une diminution significative de la puissance des ondes θ, β et γ pendant les phases de REM de la période diurne. En revanche, malgré l'effet constaté sur la proportion de sommeil NREM, aucune modification de l'activité cérébrale n'est constatée durant ces phases.



<u>Figure 101</u> : Schéma hypothétique des interactions pouvant inhiber le REM et la génération de l'onde θ par l'hippocampe.

La scopolamine induit une baisse du REM et de la génération des rythmes θ via le blocage des fibres cholinergiques.
Le peptide Aβ localisé dans l'hippocampe induit une baisse de la génération des rythmes θ via le blocage des fibres glutamatergiques de la boucle trisynaptique, mais sans provoquer d'altération du REM.
Lors de la MA, les deux types de fibre sont atteints, induisant une altération des rythmes θ et du REM.

14.4. Discussion

La scopolamine, qui est antagoniste muscarinique cholinergique, est injectée en intrapéritonéale donc induit un effet systémique et non focalisé à l'hippocampe. Il est donc difficile de comparer les effets rencontrés à ceux obtenus avec notre modèle de MA. Néanmoins, nous avons pu remarquer qu'il existe un effet commun entre les rats traités avec le peptide Aβ42 en intrahippocampal et les rats traités avec la scopolamine : il s'agit d'une modification du sommeil paradoxal avec la diminution de la puissance de l'onde θ. Cette observation est cohérente avec les données retrouvées dans la littérature où l'hippocampe est décrit comme jouant un rôle important dans le REM et dont le fonctionnement se traduit notamment par la génération de rythmes θ, or les fibres cholinergiques innervant l'hippocampe et provenant de noyaux centraux tel que le noyau basal de Meynert interviennent directement dans le fonctionnement de l'hippocampe et la génération des rythmes θ (voir chapitre 4). De plus, cette diminution de la puissance de l'onde θ pendant le REM intervient avec la dose la plus faible de scopolamine. D'après nos résultats obtenus avec le RAWM à trois positions de plateforme (voir chapitre 10) et d'après Kay (Kay et al., 2010), la scopolamine agit d'abord sur la mémoire de travail puis sur la mémoire de référence suivant des doses croissantes, or la mémoire de travail serait directement dépendant du bon fonctionnement de l'hippocampe (voir chapitre 3.1.3). Une baisse de la puissance de l'onde θ pendant les phases de REM enregistrée à la surface du crâne constituerait donc un biomarqueur d'une dysfonction de l'hippocampe pouvant être causée soit par des lésions directes de son réseau neuronal (injection intrahippocampique de peptide Aβ), soit par une perturbation des fibres cholinergiques situées en amont (antagoniste cholinergique), soit les deux comme dans la MA (**figure 101**).

Un autre point à soulever est que la perturbation des fibres cholinergiques induite par la scopolamine a entrainé une augmentation de l'activité des animaux pendant leur phase de repos donc perturbe les cycles éveil/sommeil. Une perturbation de ces cycles est également retrouvée dans la MA mais à des stades avancés, c'est-à-dire où une large partie du cerveau est atteint par les différentes lésions, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle de MA.

Partie 3 : Discussion générale et perspectives

15. Discussion

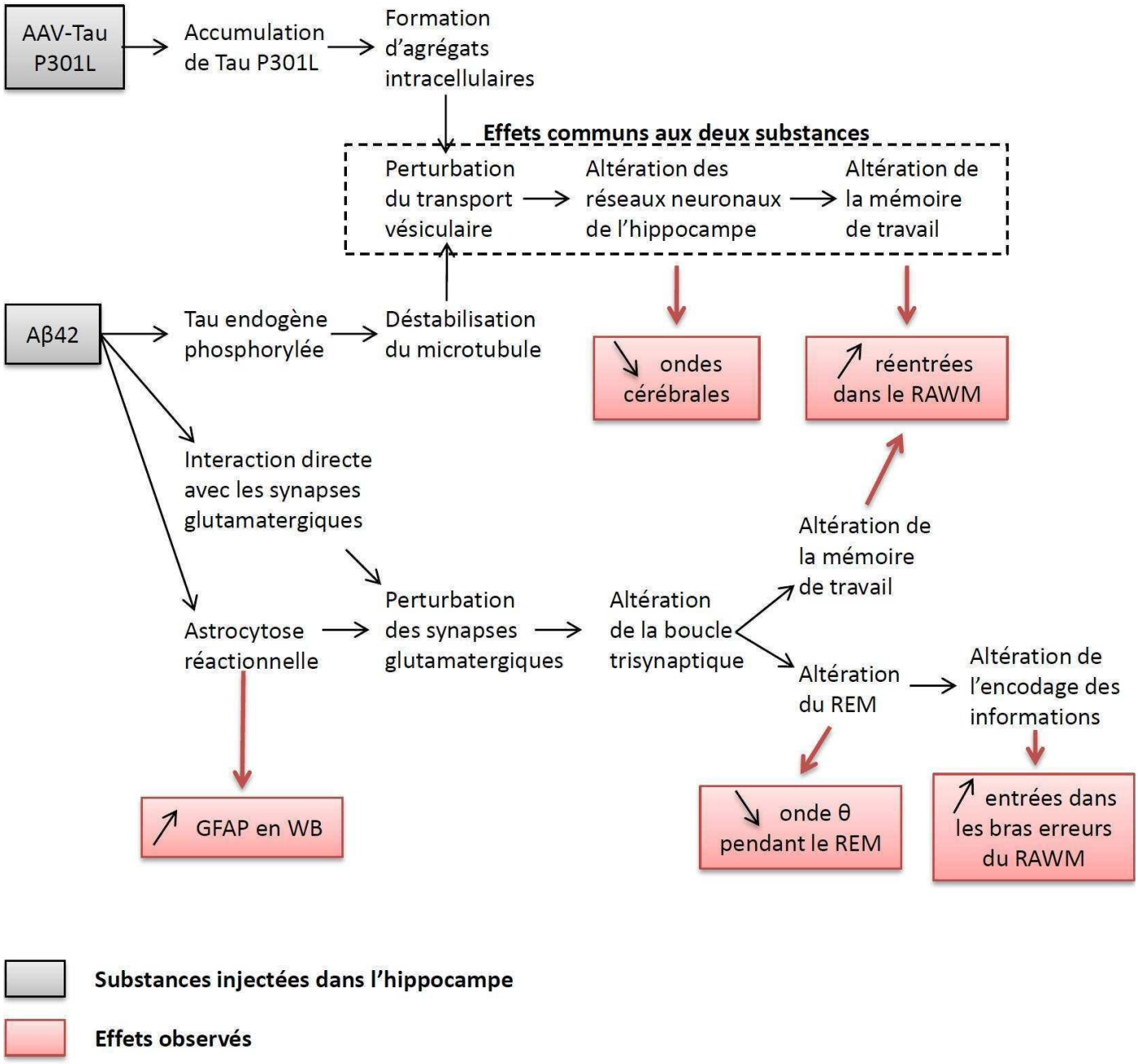
Au sujet du modèle développé :

Plusieurs expériences ont été conduites dans le cadre de ces travaux de thèse afin de développer un modèle animal de la MA répondant le plus possible aux critères suivants :

- Modèle animal non transgénique reproduisant les deux lésions histologiques caractéristiques de la MA.
- Présence d'une altération de la mémoire.
- Les variations de certains paramètres doivent être reproductibles et facilement évaluables.
- Les lésions ainsi que les altérations qui leurs sont associées doivent être durables dans le temps et éventuellement présenter une certaine progressivité.

Le modèle ainsi retenu correspond au groupe Abeta-Tau (injection concomitante) des expériences n°3 et n°4 car il répond à l'ensemble de ces critères. Il présente les deux types de lésions histologiques, à savoir les dépôts extracellulaires de peptide amyloïde et les inclusions intracellulaires de la protéine Tau phosphorylée. Une altération de la mémoire ainsi que des changements de l'activité électrique cérébrale ont pu être mis en évidence chez ces animaux. Le suivi longitudinal de leur activité électrique cérébrale a montré que les effets sur le SNC induits par les différentes substances ne régressent pas avec le temps. Cependant, seul le groupe Abeta-Tau de l'expérience n°5, qui consistait à injecter le vecteur AAV-Tau un mois avant le peptide Aβ42, afin de simuler une vulnérabilisation des neurones, a montré une réelle progression dans le temps des effets observés sur l'activité électrique du cerveau. Ce dernier modèle semble donc prometteur, mais nous manquons de données permettant de le caractériser notamment au niveau d'une éventuelle altération de la mémoire et d'un point de vue biochimique. De plus, ce modèle est plus « lourd » à mettre en place car il nécessite deux chirurgies.

Dans le cas du modèle que nous avons retenu, le peptide Aβ42 a été injecté sous forme soluble (non pré-agrégé), et présente plusieurs niveaux d'oligomérisation, mais sans la formation des fibrilles observées avec la forme pré-agrégée à 37°C. La forme soluble semble s'agréger *in vivo* car des dépôts du peptide sont retrouvés après trois mois post-injection, reproduisant ainsi les dépôts diffus observés dans la MA. L'injection de peptide Aβ sous forme fibrillaire n'a pas été retenue du fait de l'absence d'altération de la mémoire constatée avec le groupe Abeta de l'expérience n°2. De plus, plusieurs travaux décrivent les formes fibrillaires comme moins toxiques que les forme oligomériques solubles (Dahlgren et al., 2002)(Chambon et al., 2011), voire pratiquement inertes après une injection intracérébrale chez le rat (Winkler et al., 1994). La pathologie neurofibrillaire a été reproduite avec l'injection du vecteur AAV9-Tau P301L à la dose de $2,1.10^9$ particules. L'injection de ce vecteur a permis de faire surexprimer la protéine Tau par plusieurs cellules transfectées et présentes au sein des couches neuronales de l'hippocampe. Après trois mois post-injection, une accumulation de la protéine Tau anormalement phosphorylée est observée autour des noyaux des cellules présentes dans différentes couches de l'hippocampe. Ces marquages présentent la forme typique d'une « flamme », caractéristique de la DNF retrouvée au niveau des neurones pyramidaux



Substances injectées dans l'hippocampe

Effets observés

<u>Figure 102</u> : Représentation hypothétique des effets de l'injection de l'AAV-Tau P301L ou du peptide Aβ42 au niveau de l'hippocampe.

WB : Western-Blot.

de l'hippocampe chez des personnes atteintes de MA. De nombreux autres marquages de la protéine Tau anormalement phosphorylée, se présentant sous la forme de filaments et de points, sont observés à distance des noyaux cellulaires. Ces types de marquages correspondent aux lésions de type fibres tortueuses. Ces deux types de lésions neurofibrillaires, observés chez les rats ayant reçu une injection du vecteur AAV-Tau, nous permettent de conclure que cette méthode par transfert de gène est une bonne alternative aux modèles transgéniques, permettant ainsi de reproduire plusieurs aspects de la tauopathie rencontrée dans la MA.

Contrairement à un modèle transgénique, l'injection des différentes substances réalisée dans la fissure de l'hippocampe par stéréotaxie, permet d'induire le développement des différents types de lésions spécifiquement au niveau de l'hippocampe et ainsi de reproduire un stade précoce de la MA. L'idée que notre modèle est plus représentatif d'une étape relativement précoce du développement de la MA, est également confortée par le fait que nous n'avons pas constaté une réelle perte de neurones ou une augmentation du niveau de protéines pro-apoptotiques dans la région de l'hippocampe (Sun et al., 2012). L'obtention d'un modèle représentatif des phases précoces de la MA représente un avantage pour le développement et l'évaluation de futures thérapies en recherche préclinique, car un des enjeux dans la maladie d'Alzheimer est d'intervenir le plus tôt possible. En effet, la MA étant actuellement diagnostiquée qu'à ses stades tardifs : pas avant le stade V avec des lésions présentes dans une large partie du cerveau (Delacourte and Buée, 2005), certains chercheurs émettent l'hypothèse que l'échec des thérapies rencontrées en phase clinique est liée à cette prise en charge tardive (Thal et al., 2002)(Sperling et al., 2011)(Abdel-Aal et al., 2011).

<u>Au sujet des effets du peptide Abeta et de la protéine Tau et d'une éventuelle synergie</u> :

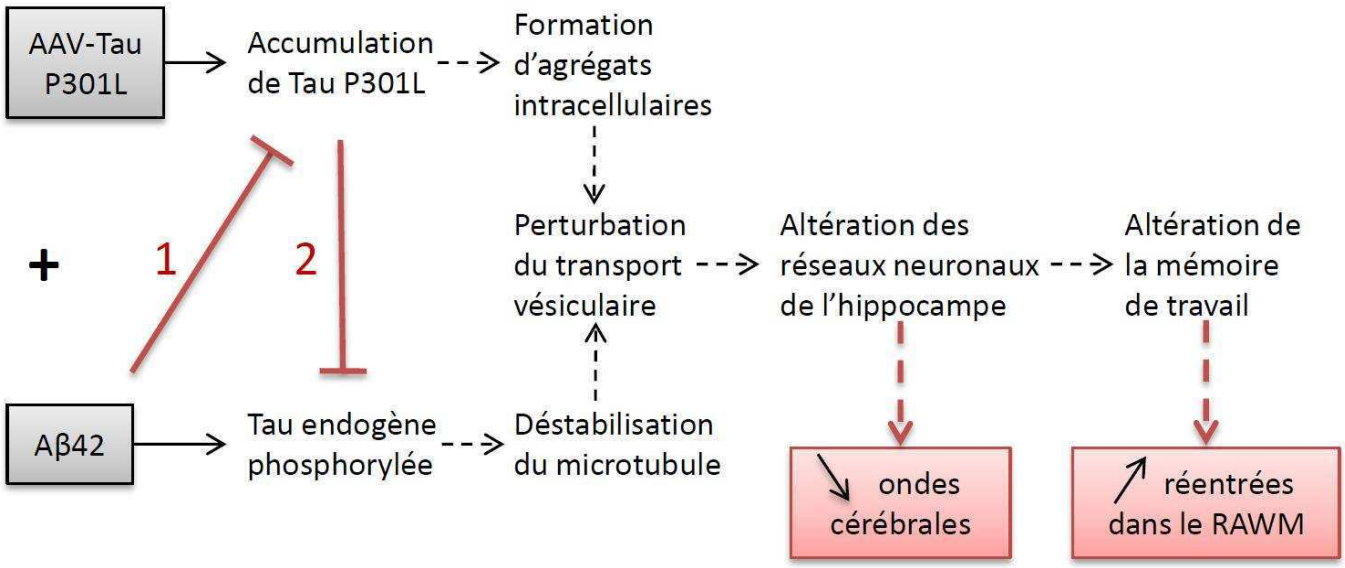
Les rats ayant reçu une injection seule, soit de peptide Aβ42, soit du vecteur AAV-Tau, ont permis de mettre en évidence que ces deux substances agissent de manière différente sur le cerveau. En effet, en plus d'une baisse globale de l'activité électrique constatée avec ces deux substances et qui témoigne probablement d'une dysfonction de plusieurs réseaux neuronaux (Tsolaki et al., 2014), le peptide Aβ42 (forme soluble) a également induit d'autres effets qui ne sont pas retrouvés avec les lésions de type neurofibrillaire. Il s'agit d'une astrocytose réactionnelle, d'une altération de la mémoire plus importante avec notamment un déficit de la mémoire de référence et de la capacité d'apprentissage, ainsi qu'une baisse plus importante de la puissance des ondes pendant le REM et plus particulièrement l'onde θ. Nous émettons l'hypothèse (**figure 102**) que les deux substances provoquent une altération du transport vésiculaire au niveau de l'ensemble des réseaux de l'hippocampe, incluant ses voies d'entrées et de sorties vers d'autres structures du cerveau et expliquant ainsi que la baisse de la puissance des ondes observées ne concerne pas seulement l'onde θ qui est spécifique à l'activité des neurones pyramidaux (voir chapitre 4.5). Cette altération peut provenir de l'accumulation d'agrégats de la protéine Tau humaine pour les rats ayant reçu uniquement le vecteur AAV-Tau, ou d'une phosphorylation de la protéine Tau endogène entrainée par le peptide Aβ42 via une interaction avec des kinases (voir chapitre 1.3.3.2) et entrainant une déstabilisation du microtubule, d'autant plus qu'une augmentation de la protéine Tau phosphorylée endogène a déjà été mise en évidence chez des modèles Alzheimer de rongeur, sans pour autant observer la formation d'agrégats (Cao et al., 2009)(Masliah et al., 2001). En revanche, nous pensons que les dépôts de peptide Aβ sont responsables d'une autre action au niveau synaptique. Ils induiraient, de part leur caractère extracellulaire, une forme de réaction inflammatoire chronique observée avec l'augmentation du niveau de la GFAP, marqueur d'une réactivité astrocytaire.

En condition physiologique, les astrocytes sont connus comme intervenant activement dans la transmission synaptique glutamatergique de type NMDA, dont notamment avec la recapture du glutamate (Pita-Almenar et al., 2006)(Levenson et al., 2002) ou la sécrétion de substances neuroactives nécessaires à la transmission synaptique : glutamate (Carmignoto and Fellin, 2006) ; Ca^{2+} (Henneberger et al., 2010)(Duffy et al., 2008) ; lactate (nécessaire au métabolisme des neurones, Newman et al., 2011). Les astrocytes, en condition « normale », participent donc à la génération des ondes θ et à la formation des LTP (Kang et al., 2013), et donc à la formation de la mémoire au niveau de l'hippocampe. En présence des dépôts de peptide Aβ de manière chronique, les astrocytes pourraient ne plus jouer leur rôle de « soutien » des synapses glutamatergiques et donc être à l'origine d'une dysfonction du REM avec notamment la forte baisse de la puissance de l'onde θ et une altération de l'encodage à long terme de la mémoire, le REM jouant un rôle dans le stockage d'informations nouvelles (Squire et al., 2004). Il n'est pas exclu que les astrocytes jouent le même type de rôle dans la MA, une forte astrocytose étant constatée au niveau de l'ensemble du cerveau (à proximité ou à distance des lésions histologiques) des patients touchés par cette démence (Delacourte, 1990), qui est également associée à une dysfonction du REM (voir chapitre 4.2). Une autre explication pourrait provenir d'un effet synaptotoxique spécifique aux synapses glutamatergiques induit par les formes solubles extracellulaires du peptide Aβ, avec par exemple, une inhibition de la recapture du glutamate pouvant notamment perturber le fonctionnement des synapses avec une perte de leur capacité à former une LTP (voir chapitre 1.3.1.1 et chapitre 3.1.3.3).

En revanche, nous avons été surpris de ne pas constater, au minimum, la présence d'effets additionnels liés à la présence des deux types de lésions. Il semble même qu'il y ait eu une interaction entre les deux substances co-injectées, induisant une protection contre les effets délétères de chacune d'entre-elles. Nous avons constaté que la baisse de la puissance des ondes est moins marquée chez les rats ayant reçu la co-injection des deux substances en comparaison avec ceux ayant reçu seulement le peptide Aβ, et que les marquages de la protéine Tau phosphorylée sont moins nombreux et moins étendus quand l'injection du vecteur AAV-Tau est réalisée avec l'injection du peptide Aβ. De plus, nous n'avons pas observé de réelles différences au niveau des performances dans le RAWM, entre le groupe Abeta et le groupe Abeta-tau. Nous expliquons simplement le fait que le peptide Aβ « protège » des lésions neurofibrillaires par le fait que l'injection de ce peptide, dans la même zone que l'injection du vecteur, induit un « terrain défavorable » à la transfection des cellules par un vecteur viral et à une forte expression d'une protéine induite par l'apport d'un transgène. Ce terrain défavorable proviendrait notamment de l'effet pro-inflammatoire du peptide et de ses effets cytotoxiques (voir chapitre 1.3.1.1). Ce qui semble plus surprenant est que l'injection du vecteur AAV-Tau ait pu limiter les effets du peptide Aβ. Nous émettons deux hypothèses à ce sujet :

- Suite à un certain stress cellulaire induit par le peptide Aβ, la protéine Tau peut se retrouver à certains niveaux de phosphorylation, entrainant son passage dans le noyau pour y jouer un rôle neuroprotecteur. Ce type d'effet ayant déjà été observé, *in vitro*, par certains auteurs (Sultan et al., 2011).

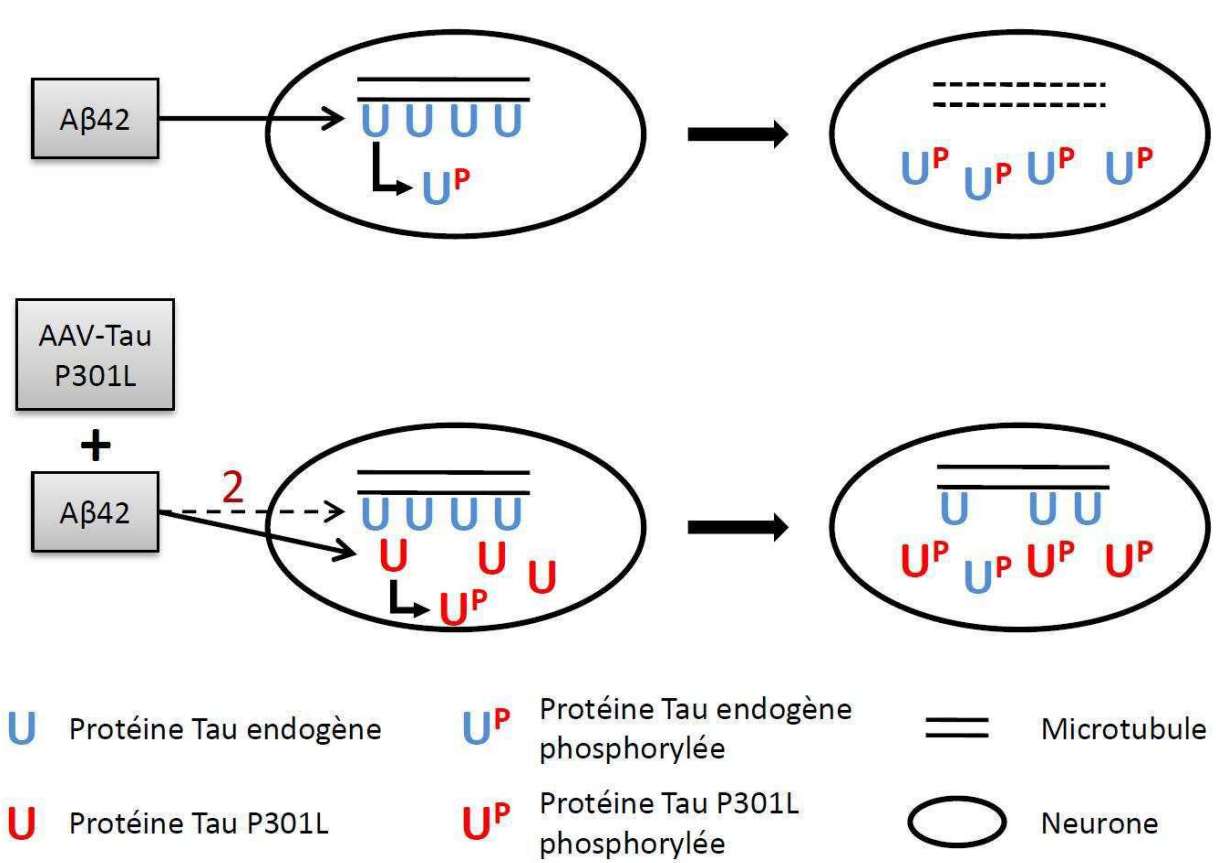
A



1 La présence du peptide Aβ limite la transfection par le virus et/ou limite l'expression de la protéine Tau humaine.

2 L'accumulation de la protéine Tau humaine P301L limite la phosphorylation de la protéine Tau endogène.

B



<u>Figure 103</u> : Représentation hypothétique de la synergie rencontrée entre le peptide Aβ42 et la protéine Tau mutée dans notre modèle animal de MA.

A : Action des deux substances l'une sur l'autre, limitant les effets observés.

B : Représentation de l'effet protecteur de la protéine Tau mutée, sur l'action neurotoxique du peptide Aβ42.

- La production de protéine Tau induite par l'apport du transgène, conduirait à la création d'un « stock » de cette protéine exogène, induisant une protection contre la déstabilisation du microtubule entrainée par le peptide Aβ via la phosphorylation de la protéine Tau endogène (**figure 103**). La mutation P301L présente sur la protéine Tau codée par le vecteur, induit, en plus d'une diminution de l'affinité pour le microtubule, une phosphorylation « facilitée » notamment par l'enzyme GSK3 sur les sites S 396 et 404 (Terwel et al., 2008)(Spittaels et al., 1999)(Khandelwal et al., 2012). La phosphorylation induite par le peptide Aβ se ferait alors préférentiellement au niveau de la protéine Tau humaine et non sur la protéine Tau endogène, maintenant ainsi l'intégrité des microtubules. Les effets délétères du peptide Aβ seraient alors seulement dus à son interaction avec les astrocytes et/ou les synapses.

Un rôle bénéfique de la protéine Tau humaine présentant la mutation P301L, sur les effets délétére d'une surcharge amyloïde au niveau de la mémoire, a déjà été décrit par Dave Morgan et son équipe chez des souris transgéniques issues du croisement de souris surexprimant le gène de l'APP muté avec des souris surexprimant le gène de la protèine Tau avec la mutation P301L (Morgan et al., 2008). Les résultats d'EEG de notre expérience n°5 vont également dans le sens de cette dernière hypothèse : en injectant le vecteur un mois avant le peptide Aβ, un stock plus important de protéine Tau P301L a pu se développer au sein des cellules, sans pour autant être suffisamment important pour provoquer des effets délétères. Après injection du peptide Aβ42, l'effet sur les EEG (quatre semaines après l'injection du peptide et huit semaines après l'injection du vecteur) était encore moins marqué en comparaison avec le groupe Abeta-Tau de l'expérience n°4 après huit semaines post injection, ou en comparaison avec le groupe Abeta après quatre semaines post-injection. Néanmoins, une forte diminution la puissance de l'onde θ a ensuite été mise en évidence lors des semaines 10 et 11 post-injection, laissant à penser qu'un certain seuil a été franchi par exemple avec la formation d'un grand nombre d'agrégats de protéine Tau P301L. Une amplification de la formation de ces agrégats pourrait alors être favorisée avec la phophorylation anormale de la protéine Tau P301L induite par une surcharge amyloïde chronique, suite à l'injection du peptide Aβ42. Ce type d'accélération de la formation d'agrégats de protéine Tau P301L a déjà été décrit après une injection intracérébrale de peptide Aβ, chez des souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine P301L (Götz et al., 2001a). Ce dernier modèle pourrait alors être plus proche de la maladie humaine car, lors des premiers stades de la propagation des DNF, les agrégats de Tau phosphorylée limités au système limbique, ne seraient pas en contact avec les dépôts amyloïdes. L'accélération de la formation des DNF ainsi que leur propagation au reste du cerveau se feraient avec l'apparition d'une surcharge amyloïde au niveau des neurones du limbique, préalablement atteints par les DNF (hypothèse alternative à la cascade amyloïde : voir chapitre 1.3.3.1). Néanmoins une altération de la mémoire et des changements concernant des paramètres biochimiques restent à mettre en évidence sur ce modèle.

Nous avons donc développé, avec l'expérience n°3 et n°4, trois modèles animaux de la MA :

- Un modèle spécifique des lésions de type dépôts de peptide Aβ.
- Un modèle spécifique des lésions de type neurofibrillaire.
- Un modèle reproduisant les deux types de lésions, mais dont les effets induits par chacune des lésions sont « bridés ». Ce dernier modèle reste néanmoins très intéressant dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'une stratégie thérapeutique, car elle devra agir sur ces deux

types de lésions afin de rétablir certaines altérations comme la baisse globale de l'activité électrique cérébrale ou l'augmentation des erreurs de type mémoire de travail.

Au sujet des techniques utilisées dans la caractérisation du modèle :

- Evaluation histologique et biochimique :

Ces deux techniques se sont avérées complémentaires l'une de l'autre. En effet, il est compliqué d'effectuer certaines interprétations uniquement à partir de l'une ou de l'autre. L'histologie nous a permis de réaliser des observations qualitatives d'une zone précise du cerveau, ceci ne reflétant pas forcément un phénomène présent dans l'ensemble d'une région cérébrale. A l'inverse, les analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence des changements présents dans l'ensemble de la structure hippocampique, ou d'éviter certaines erreurs d'interprétation. Par exemple, nous avons constaté une forte détérioration de la couche dorsale du gyrus denté à proximité du site d'injection qui aurait pu faire penser que les substances injectées induisent une forte perte de neurones au sein de l'hippocampe, ce qui n'a pas été confirmé par le marquage avec NeuN en Western-Blot. Le même type d'interprétation à pu être effectué avec la microglie qui semble être réactive seulement à proximité des lésions contrairement aux astrocytes.

Ces deux techniques ont été essentielles dans le développement et la compréhension du modèle, mais elles ne sont pas forcément adaptées à la recherche préclinique, dans le but d'étudier l'efficacité d'une stratégie thérapeutique. En effet, il paraît compliqué de réaliser une quantification de certains paramètres en histologie et seul le paramètre relatif aux astrocytes a montré un changement lors des analyses biochimiques. De plus, ces techniques sont relativement longues et coûteuses, et nécessitent le sacrifice des animaux.

- Test de mémoire :

Le dispositif de labyrinthe à bras radiaux immergés (RAWM) avec le protocole à trois positions de plateforme successives, a permis de détecter des perturbations de la mémoire, et ce malgré le fait d'un manque de perte neuronale induit par les deux substances injectées. Ce protocole nous a également permis de distinguer les effets concernant la mémoire de travail de ceux concernant la mémoire de référence. Nous avons alors pu constater que les lésions de type neurofibrillaire, contrairement aux dépôts de peptide Aβ, n'affectent que la mémoire de travail, comme ce qui a été décrit dans les travaux de l'équipe du Pr. Klein en utilisant deux tests de mémoire différents : un test d'alternance spontanée (Ramirez et al., 2011)(Mustroph et al., 2012) et un test de navigation spatial (Dayton et al., 2012b). Ce test permet également de s'affranchir de certains biais rencontrés dans le Morris Water Maze comme celui lié à l'influence d'un traitement sur la vitesse de nage.

Les scores obtenus au test évaluant les deux types de mémoire sur nos animaux Alzheimer seront améliorés en cas de traitement avec des molécules efficaces. Néanmoins, il subsiste plusieurs limites à ce test :

- Comme l'ensemble des tests comportementaux, ce test semble sensible à des changements d'environnement. Par exemple, il est apparu impossible de réaliser une évaluation de la mémoire sur des animaux instrumentés avec le système d'électroencéphalographie.
- Les résultats obtenus sont relativement hétérogènes. Il est donc préférable de travailler sur des effectifs d'animaux importants afin de renforcer la valeur des interprétations réalisées.

- Un suivi longitudinal semble compliqué car la répétition du test semble provoquer une perte de sensibilité de ce dernier. Cependant, ce phénomène a été constaté uniquement avec le protocole à une position de plateforme. Il serait intéressant de tester ce phénomène avec le protocole à trois plateformes en utilisant la scopolamine comme substance de référence.
- Le protocole à trois positions de plateforme, mis au point dans le but d'augmenter la sensibilité au niveau du paramètre de mémoire de travail, est relativement long et contraignant à réaliser. Ce test nécessite donc une de main d'œuvre importante, ce qui le rend relativement coûteux dans le cadre d'études réalisées dans l'industrie pharmaceutique.

➢ Analyse des EEG :

L'analyse de la puissance des ondes cérébrales, réalisée par télémétrie, permet d'effectuer un suivi longitudinal des cycles éveil/sommeil et de l'activité électrique du cerveau. Ceci permet ainsi d'évaluer l'évolution de certaines perturbations consécutives à un traitement et ce, sans aucune manipulation des animaux, ce qui évite le stress lié à une contention ou a un changement de leur environnement. De plus, une fois les animaux instrumentés et les données pouvant être traitées par un algorithme, cette technique ne nécessite que très peu de main d'œuvre, ce qui la rend particulièrement intéressante dans le cadre d'un « screening » réalisé par un groupe industriel. La durée maximale du suivi dépend seulement de la durée de vie des batteries qui peut aller jusqu'à 60 semaines, à raison de 24 heures d'enregistrement par semaine.

L'analyse des ondes réalisée état par état, relativement rare voire inexistante dans la littérature, a également permis de mettre en avant un effet plus marqué, concernant une baisse de la puissance des ondes, pendant les phases de REM et chez les animaux ayant reçu une injection de peptide Aβ (groupe Abeta et Abeta-Tau). L'hippocampe est connu pour être en activité pendant ces périodes de REM avec notamment la génération des rythmes θ. La diminution de la puissance de l'onde θ pendant les périodes de REM constituerait donc le reflet d'un dysfonctionnement de l'hippocampe pouvant être prédictif d'une altération de la mémoire, ce qui constitue un paramètre précis à évaluer dans le cadre du développement d'une stratégie thérapeutique en recherche préclinique. Chez les rats ayant reçu une injection seule de vecteur AAV-Tau, une baisse de la puissance de l'onde θ est également observée pendant les phases de REM, mais avec une intensité qui n'est pas plus importante qu'avec les autres ondes. Nous supposons donc que l'hippocampe a subit seulement de « légères » perturbation avec les lésions neurofibrillaires, qui ne suffisent pas à inhiber le fonctionnement normal de l'hippocampe, d'autant plus que la mémoire de référence et les capacités d'apprentissage n'ont pas été atteintes chez ces animaux.

Au sujet des travaux réalisés chez des patients atteints de MA, des résultats inverses sont retrouvés au niveau de la puissance de l'onde θ. Mais ces résultats ont été observés à des stades avancés du développement des lésions. En effet, ces études cliniques sont réalisées soit chez des patients dont la démence est avérée, soit chez des patients souffrant de MCI. A ces stades, les lésions se sont propagées dans une large partie du cerveau et une forte perte neuronale est observée dans la région rhinale et l'hippocampe, contrairement à notre modèle (cf. stades de Braak et Braak : chapitre 1.3.2.1). Des auteurs décrivent cette augmentation de la puissance de l'onde θ comme liée à des phénomènes de compensation où certaines structures du cerveau prennent le relai de celles n'assurant plus leur rôle (Rodriguez et al., 2011)(Hot et al., 2011).

Il n'est donc pas exclu qu'une diminution de la puissance des rythmes θ puisse apparaître lors des premiers stades asymptomatiques de la MA. Cette diminution pourrait alors constituer un marqueur précoce qui permettrait, en prenant en compte d'autres paramètres comme des facteurs héréditaires et environnementaux, de faciliter une prise en charge rapide de la MA, d'autant plus qu'une analyse des EEG constitue une opération facile à mettre en place et non invasive chez l'Homme (Tsolaki et al., 2014). Plusieurs auteurs préconisent d'ailleurs l'utilisation des EEG pour le diagnostic de la MA (Leiser et al., 2011)(Platt et al., 2011), car des anormalités de l'activité électrique du cerveau révélées par EEG sont le reflet d'une atteinte anatomique et/ou fonctionnelle du cortex cérébral des patients atteint de MA (Tsolaki et al., 2014).

Malgré la différence constatée au niveau de l'onde θ, il existe un point commun entre nos travaux et les résultats obtenus chez les patients atteints de MA ou de MCI avant une conversion en démence : une perturbation du sommeil paradoxal est observée dans les deux cas. Chez des patients atteints de MA, une diminution de la quantité de REM est observée (voir chapitre 4.2). Dans notre modèle (co-injection Abeta et Tau), les anormalités constatées au niveau des ondes cérébrales sont plus importantes pendant les phases de REM, laissant supposer une altération de ces phases. Le REM étant connu pour son rôle dans le stockage d'une information à long terme, une altération de ce dernier pourrait alors être à l'origine des troubles de l'apprentissage rencontrés dans notre modèle ou avec les premiers signes cliniques de la MA.

Conclusion :

Nous avons développé, notamment avec l'analyse du sommeil paradoxal par électroencéphalographie, un outil d'évaluation en recherche préclinique dans la maladie d'Alzheimer, permettant d'évaluer l'efficacité de diverses stratégies thérapeutiques dirigées contre les lésions de type « Alzheimer », ou produisant un effet procognitif ou neuroprotecteur visant à contrer les perturbations induites par ces lésions. Le modèle utilisé peut être adapté en fonction du mécanisme d'action du traitement à évaluer : injection de peptide Aβ42 ou d'AAV-Tau seule si le traitement agit spécifiquement sur l'un ou l'autre ; co-injection des deux substances si le traitement n'est pas spécifique à l'une de ces lésions.

16. Perspectives

Afin d'améliorer les connaissances que nous avons de notre modèle de MA, les futurs axes de recherche devront s'intéresser aux points suivants :

- Caractériser, par microscopie électronique, la structure tridimensionnelle des inclusions de la protéine Tau et des dépôts de peptide Aβ, afin de valider une éventuelle structure en forme de PHF intracellulaires ou de fibrilles extracellulaires caractéristiques de la DNF et des dépôts amyloïdes de la MA.
- Réaliser une quantification des cytokines pro-inflammatoires par technique ELISA, afin de valider l'éventuelle neuro-inflammation.
- Vérifier l'existence d'une éventuelle corrélation entre l'augmentation du niveau de la GFAP ou de cytokines pro-inflammatoires, et la baisse de la puissance des rythmes θ.
- Réaliser une analyse des décharges épileptiques sur nos données d'EEG dans le but d'identifier une éventuelle augmentation de leur nombre.
- Caractériser plus précisement le modèle de l'expérience n°5 qui pourrait s'avérer plus proche de la MA.
- Réaliser un suivi longitudinal de l'évolution des EEG sur des animaux de l'expérience n°5, sur une durée plus longue, et ainsi vérifier que la progression de l'altération des ondes cérébrales se poursuit avec le temps. En cas de neurodégénérescence progressive et continue de l'hippocampe, des perturbations de l'architecture du sommeil pourraient également être observées avec, en particulier, une diminution de la proportion de REM. La diminution des rythmes θ pendant les phases de REM deviendrait alors prédictive d'une future altération du sommeil.
- Eventuellement, tester une autre approche concernant la co-injection du peptide Aβ et du vecteur AAV-Tau, par exemple en injectant le peptide en intracérébroventriculaire et en maintenant l'injection du vecteur au niveau de la fissure de l'hippocampe.

Malgré le fait qu'il reste encore plusieurs travaux à réaliser afin de caractériser au mieux notre modèle, la majorité des critères de départ sont atteints et permettent de tester l'effet de substances neuroprotectrices ou pro-cognitives. Il serait notamment intéressant d'évaluer, sur l'activité cérébrale des rats, l'effet des traitements pro-cognitifs actuellement utilisés dans la MA qui permettent de rétablir le niveau d'acétylcholine (donépézil) ou de limiter l'effet excitotoxique de l'accumulation de glutamate (mémantine). Au vu des résultats obtenus au niveau de la réaction astrocytaire, il serait également intéressant de tester l'effet d'un anti-inflammatoire, afin de vérifier le rôle joué par une éventuelle inflammation chronique induite par le peptide Aβ.

Partie 4 : Publication

Soumise dans Neuropsychopharmacology

Numéro de soumission : NPP-16-0213

TITLE: DEVELOPMENT OF A NON-TRANSGENIC ALZHEIMER'S DISEASE RAT: RELEVANCE OF ELECTROENCEPHALOGRAM ASSESSMENT

Running title: NON-TRANSGENIC ALZHEIMER RAT

Authors : Maleysson[1,2] Vincent, PhD, Page[1] Guylène, PhD, Klein[3] Ronald L, PhD, Haida[2] Obélia, Master, Janet[1] Thierry, PhD, Maurin[2] Anne, PhD, Richard[2] Serge, PhD, Champeroux[2*] Pascal, PhD, Fauconneau[1*]† Bernard, PhD.

Affiliations :

1: EA 3808, CiMoTheMA, University of Poitiers, France

2: Centre de Recherches Biologiques, CERB, Chemin de Montifault, 18800, Baugy, France

3: Department of Pharmacology, Toxicology, and Neuroscience, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, Louisiana, USA

*: last co-authors, equal contribution

†: corresponding author: postal address: Bernard Fauconneau, Cibles Moléculaires et Thérapeutique de la Maladie d'Alzheimer (CiMoTheMA), EA3808, University of Poitiers, Pole Biologie Santé, Bat B36, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 POITIERS Cedex 9, France

mail : bernard.fauconneau@univ-poitiers.fr

Tel : +33 549 36 62 64

Fax : +33 549 36 62 63

Maleysson V: vincent.maleysson@hotmail.fr

Page G: guylene.page@univ-poitiers.fr

Klein RL: Klein@lsuhsc.edu

Haida O: obelia.haida@univ-poitiers.fr

Janet T : thierry.janet@univ-poitiers.fr

Maurin A: anne.maurin@cerb.fr

Richard S: RICHARD@cerb.fr

Champeroux P: CHAMPEROUX@cerb.fr

Abstract

Numerous animal models of Alzheimer's disease (AD) have been developed. However, any non-transgenic models of rodent developing amyloid plaques and intracellular tangles of the Tau protein, the two histological hallmarks of AD, is currently available. The aim of this study is to develop such a model in the rat. The principle is to perform a concomitant intrahippocampal injection of a recombinant AAV (Adeno-Associated Virus) containing the human transgene tau with the P301L mutation, and of Aβ1-42 peptide, the main component of the amyloid plaques. We have obtained an animal model representative of the early steps of AD, i.e. with lesions focalized in one of the first affected brain structures in the AD: the hippocampus. The presence of the two histopathological hallmarks has been observed three months later in the hippocampus by immunohistofluorescence and associated with an astrogliosis. A memory impairment concerning more particularly the working memory is observed and abnormalities of the electrical activity of the brain and of the rapid eye movement sleep recorded by electroencephalography, are also characterized. In rats treated by the Abeta peptide (Abeta and Abeta-Tau groups), the decrease observed in the EEG bands power was more important during the REM sleep and particularly with the theta band. This effect was not observed with the Tau group. This AD model could represent a good alternative to transgenic models in the assessment of new potential neuroprotective therapies targeting earlier stages of the disease and taking in consideration the interactions between Abeta and Tau.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive decline in cognitive function, usually starting with memory complaints and possible progression involving multiple cognitive, neuropsychological and behavioral domains. The definitive diagnosis of AD comes from post mortem analysis with the characterization of histopathological hallmarks: findings of extracellular β-amyloid (Aβ) plaques, intracellular neurofibrillary tangles of tau and neuronal and synaptic loss in brain regions involved in learning and memory processes.

The development of AD models is of great importance to understand cellular and molecular mechanisms of this pathology and to test drugs against this disease. Numerous models has been used for about 20 years (for review: Laurijssens et al., 2013 ; Webster et al., 2014). However, no animal model recapitulates the entirety of AD in humans, and therefore it is important to understand both the utility and limitations of particular animal models.

Rapidly, animal models can be divided into three categories: natural models, genetic models and interventional models (Laurijssens et al., 2013).

Natural models: animals, such as dogs, cats and some non-human primates (e.g. lemur mouse, monkeys, …) spontaneously develop some AD-related neuropathological features. But one problem is that the hallmarks appear after several months or years, limiting their interest in non-clinical studies.

Genetic models: familial genetic forms of AD have led to the development of transgenic (Tg) animal models for several specific mutated genes. Most transgenic rodent models are based on the over-expression of three genes: (1) amyloid precursor protein (APP) and/or (2) presenilins (PS1 and 2), and/or (3) tau. Over-production and accumulation of the derived proteins lead, respectively to formation of amyloid deposits, Tau hyperphosphorylation and formation of neurofibrillary tangles (NFT) (Spires and Hyman, 2005). Mice, including triple transgenic models (Oddo et al., 2003), then rats were developed during the last years. However, despite similarities between these rodent models and AD, no transgenic model to date has been able to accurately demonstrate a progressive loss of cholinergic neurons in the temporal and frontal lobes of the AD brain (Braidy et al., 2012). In addition, the major criticism is that these transgenic mice represent only familial AD, which is <5% of all AD patients and this model cannot fully reproduce the features of disease progression of vast majority of AD cases that is sporadic/late-onset AD.

Interventional models: injection of substances into the brain leading to induction of lesions in specific brain regions may produce some features of AD. The first models involve the introduction of Aβ peptide (Aβ1-40/42) or a fragment (Aβ25-35) in the brain of mice (Maurice et al., 1996; Urani et al., 2002) or rat (Zussy et al., 2011). These models have led to highly pertinent pathomimetic observations and provide complementary approaches to the numerous transgenic mouse lines developed as AD models. However, injection of Aβ peptide may induce some clinical signs but it does not directly reproduce the lesions of the disease (Duyckaerts et al., 2008). It mimics only the amyloid toxicity observed in AD physiopathology, but not the all the processes involved in tau protein hyperphosphorylation and formation of neurofilament tangles (NFT) (Zussy et al., 2011).

Klein et al. (2005, 2006, 2008) developed a rat model expressing the microtubule-associated protein tau, after intracerebral injection of several variants of adeno-associated virus (AAV) vectors. They induced neurofibrillary tangle formation, the other hallmark of AD, and mimicked features of human neurological diseases involving tangle or tau pathology. In particular, AAV9 vectors, carrying human tau P301L mutation, injected in brains of rats showed that tau expression reached higher levels at earlier intervals than other AAV (Klein, 2008, 2009).

However, no non-transgenic rodent developing at the same time amyloid plaques and NFT is currently available.

In this paper, we report development of an AD model by using a concomitant introduction of Abeta and an AAV expressing tau, which has never been attempted before. In order to assess effects of each treatment, we recorded EEG (electroencephalogram) to evaluate any change on the sleep wake cycle and on the power of each brain's rhythm (delta, theta, alpha, beta and gamma) during the different sleep/wake states of rats. The main biochemical and behavioral characteristics are also presented.

We have chosen rat, since this rodent offers numerous advantages. The rat is physiologically, genetically and morphologically closer to humans than mice (Gibbs et al., 2004; Jacob and Kwitek, 2002; Lin, 1995). Its larger body and brain size facilitates intracerebral administration of drugs, multiple sampling of biological fluids and neurosurgical and neuroimaging procedures. Rats have finer and more accurate motor coordination than mice and exhibit a richer behavioral display. They also display a more complex social behavior (Do Carmo and Cuello, 2013).

Materials and Methods

Animals

Male Sprague Dawley rats (Janvier, Le-Genest-St-Ile, France) aged between 8-10 weeks and weighing 280-350 g were used. The animals were housed in a controlled environment with a temperature between 20 and 24°C and 12 hours light/dark cycle (light off at 7:30 pm). Feed and water were available *ad libitum*.

All experiments were subjected to ethical review (ethical committee n° CEEA-111) according to 2010/63/UE animal welfare European directive. Studies were undertaken following the 3R rule (Replacement, Reduction and Refinement) including standard operating procedures for environmental enrichment and animal welfare in a GLP testing facility.

Experimental design

Two batches of rats were used: one batch for the memory assessment (memory batch) and one batch for the EEG recording (EEG batch). The animals were randomly dispatched in four groups of 12 animals each for the memory batch and four groups of seven animals each for the EEG batch. After an acclimatization period of one week, the rats received a bilateral intrahippocampal injection of different substances following this scheme:

- Vehicle group injected with Ringer lactate
- Abeta group injected with 2 nmol of Aβ 1-42 peptide
- Tau group injected with $2.1.10^9$ particles of AAV9 containing the human tau gene with the P301L mutation
- Abeta-Tau group injected with both Aβ 1-42 peptide (2 nmol) and AAV9 ($2.1.10^9$ particles)

For the memory batch, cognitive assessment was performed 12 weeks after injections using a Radial Arm Water Maze (RAWM) paradigm. Then, animals were sacrificed on the 13rd week for a biochemical analysis of brains. Histological assessment on brains of several animals of each group was also performed to confirm the presence of the two specific hallmarks (amyloid deposits and NFT).

For the EEG batch, a radio transmitter and the electrodes were implanted the day of the injection and EEG recordings were performed by telemetry from the third week after injection (after a recovery period) up to the twelfth week after injection (figure1).

Substances injected

The solution of Ringer lactate was obtained from Lavoisier (Paris, France).

The Aβ 1-42 peptide powder was obtained from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France) and was dissolved the day of the injection in Ringer lactate at the concentration of 2.26 mg/mL.

The AAV9 particles (Adeno-Associated Virus serotype 9) containing the human transgene tau P301L were generously provided by R.L. Klein (Dept. Pharmacology, LSUHSC-Shreveport). The expression of the transgene is controlled by the hybrid cytomegalovirus/chicken β-actin promoter and enhanced by the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulator element (Mustroph et al., 2012). The AAV9 particles were diluted in Ringer lactate at the concentration of $5.25 .10^8$ particles/mL before injections.

Intrahippocampal injection

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg by intraperitoneal route) then placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Düsseldorf, Germany). Body temperature was controlled using a heating pad (CMA Microdialysis, Kista, Sweden) during surgeries and until animals wake up. An incision was performed under aseptic conditions over the cranial midline. Two holes were drilled in the skull (two injection sites) and the dura was pierced with a 23G needle. Intrahippocampal injections were performed bilaterally at the following coordinates relative to the Bregma (Paxinos & Watson): anteroposterior: -4mm; mediolateral: ± 2.6mm; dorsoventral: -4.5mm (relative to the skull surface). Intrahippocampal injections were performed using a Hamilton syringe of 10µL with a 26G needle placed in a microinjector (LEGATO 130, KD Scientific, Holliston, MA, USA) at a rate of 2 µL/min and following this scheme:

- Vehicle group: injected twice per site with Ringer lactate (8 µL per site)
- Abeta group: injected the first time with Ringer lactate (4 µL per site) then with the peptide Aβ 1-42 preparation (4 µL per site)
- Tau group: injected the first time with the AAV9 preparation (4 µL per site) then dosed with Ringer lactate (4 µL per site)
- Abeta-Tau group: injected with the AAV9 particles the first time (4 µL per site) and then with the peptide Aβ 1-42 preparation (4 µL per site).

After each injection, the needle was left in place for two minutes then slowly withdrawn. The two holes were clogged with dental cement (Aquacem ™, Dentsply, Weybridge, UK) and the skin sutured after few minutes of drying. The animals were placed alone in their home cage and observed once a day for a recovery period of at least three days. The body weight of animals was measured on the day of surgery and then weekly.

Electrodes and radio transmitter implantation

The radio transmitter (model HD-S11 for biopotential measurement, Data Sciences International, New Brighton, MN, USA) was implanted into the intraperitoneal cavity. Two EEG electrodes were tunnelled under the skin to the head. The EEG electrodes were implanted into the frontal and parietal cortex (figure 2) using anchor screws (CMA Microdialysis, Kista, Sweden) then secured with dental cement (Aquacem ™, Dentsply, Weybridge, UK). After the end of surgery, the rats received an intramuscular injection of 0,6 µg/rat of buprenorphine (Buprecare®, Axience, Pantin, France). The animals were placed alone in their home cage and observed once a day for a recovery period of at least two weeks. The body weight of animals were measured on the day of surgery and then weekly.

EEG recording

EEG recordings were undertaken in the animal room by telemetry using a RPC-1 bioreceiver (Data Sciences International, New Brighton, MN, USA) placed below each cage. Telemetric measurements of EEG and locomotor activity were recorded continuously for at least 24 hour-periods. The individual data were collected using an ART™ acquisition system (release 4.2, Data Sciences International, New Brighton, MN, USA) and analysed in 10 second periods. The power of EEG bands was determined by a fast Fourier Transformation (FFT) depending on this frequency ranges (Louis et al., 2004; Grasing and Szeto, 1992): delta (δ: 1.5-6 Hz), theta (θ: 6-10 Hz), alpha (α: 10.5-15 Hz), beta (β: 22-30 Hz) and gamma (γ: 35-45 Hz).

Cognitive assessment

Cognitive performances of animals were assessed using a Radial Arm Water Maze (RAWM) test. The RAWM consisted of a circular pool (120 cm in diameter, height 56 cm), eight arms (length 30 cm, width 10 cm) radiating from the center of the pool and was filled with water to a height of 45 cm. Water was used at room temperature (RT) and colored with India ink. At the end of one of the eight arms (goal arm), a black platform (length 15 cm, width 10 cm) was immersed under 1cm of water. Each animal was placed individually at the extremity of the

start arm (same location for each trial) facing the pool wall. The goal for the animal was to find the hidden platform using the visual cues placed around the pool (as in Morris Water Maze test). Each animal was tested twice a day: two sessions of three trials spaced apart by five hours (one session the morning and one session the afternoon), during four days. One session consisted in three consecutive trials in which the goal arm (arm with the platform) was changed trial by trial. The three goal arms (arm with potentially presence of the platform) were always the same for each session and the position of the platform followed this schedule: first trial: position 1; second trial: position 2; third trial: position 3 (see figure 3).

During a trial, each animal was allowed to swim a maximum of 90 seconds. If the animal fails to climb onto the platform and/or to stay on during 30 seconds, it was manually guided on there and left for 30 seconds. Then, the platform was placed at the end of following goal arm and the rat was replaced in the start arm for the following trial. At the end of session, each animal was dried and placed in its home cage. Twenty-four hours after the last session, a probe test was performed where the hidden platform was removed and animals were allowed to swim during 90 seconds.

Trials were recorded with a tracking video system (Noldus Ethovision 3.1, Wageningen, Netherlands). The parameters measured were: the latency time to find the platform, the swimming speed, the occurrence of entries in the different arms, and the time spent in the different arms. An error number was calculated using the occurrence of entries for each animal. This error rate was divided in two types: an entry in a wrong arm (never fitted with platform and different from start arm) was considered as a reference memory error and a re-entry in an arm already visited within the same trial was considered as a working memory error (Kay et al., 2010). The number of errors made, as well as the latency time and the swimming speed for each session were obtained by adding the results of the three trials performed within each session. Moreover, for the reference memory, the number of errors was increased by a coefficient depending on the session number in order to amplified a reference memory impairment (i.e. session 1: error x 0 ; session 2: error x 1 ; ….. session 8: error x 7). These different results are presented as mean values (± SEM) for each group and cumulated session by session in order to normalize the results.

A test success rate was also calculated. This rate based only on the reference memory was associated to learning. The success criterion for one rat was defined by a maximum of one reference memory error committed by the rat during one complete session (three successive

trials). The test success rate for one session was obtained by adding for each group the number of rats which had accomplished the session with a maximum of one reference memory error.

Histological analysis

Thirteen weeks after injections, four animals of each group of the batch 1 were sacrificed for immunofluorescence analysis. Animals were anesthetized by sodium pentobarbital (60 mg/kg by intraperitoneal route) and were infused through the heart with 150 mL of Phosphate Buffered Saline at 4°C (PBS, 154 mM NaCl, 1,54 mM KH_2PO_4, 2,7 mM Na_2HPO_4 .$7H_2O$, pH 7,2), then with 150 mL of 4% PFA (paraformaldehyde powder, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) diluted in PBS. Brains were removed and fixed overnight in 4% PFA at 4°C. Then, brains were washed with PBS and preserved in formalin at room temperature. Coronal brain sections (4 µm thick) were performed using a microtome (SCIL/M2R-DIS, Altorf, France) after a dehydratation/paraffinage step. Sections were mounted on Superfrost Plus slides (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-bois, France) then dewaxed 2 x 10 minutes with Histosol (Shandon, Eragny, France) and rehydrated by successive ethanol baths (100%, 95%, then 75%). After several washes, antigen sites were unmasked using a boiling bath of citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6). Slides were washed and allowed to come to room temperature, then were blocked one hour at room temperature in PBS/0,3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) containing 5% of bovine serum albumin (BSA low IGG, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (diluted in PBS/0,3% Triton X-100 containing 1% of BSA): mouse monoclonal antibodies clone PHF-1 recognizing tau phosphorylated at Serine 396/404 (1:100, gift from Dr. Peter Davies, Hofstra North Shore-LIJ School of Medicine, NY, USA) and clone WO-2 recognizing amino acid residues 4-10 of the peptide Amyloïd β 1-42 (1:200, Merck Millipore, Molsheim, France). After washing with PBS, sections were incubated one hour at room temperature with the secondary antibody: anti mouse polyclonal Alexa 488-conjugated (1:50, Jackson ImmunoResearch, Beckmann Coulter distributor, Villepinte, France). Then, sections were rinsed, stained with DAPI (1:5000, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) and coverslipped with aqueous fluorescent medium (Fluoroschield, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Microscopic visualization was performed using Olympus DP70 digital camera and Olympus DP-soft (Olympus S.A., Rungis, France).

Biochemical analysis

Brain tissue preparation:

On the week of sacrifice (13 weeks after injection), eight animals per group were taken for biochemical analysis. Animals were anesthetized by sodium pentobarbital (60 mg/kg by intraperitoneal route) and were infused through the heart with 150 mL of PBS at 4°C, then, the brain was immediately removed and brain regions (hippocampus, frontal cortex, parietal cortex) were rapidly dissected and weighed. Each brain region was preserved by immersion in a liquid nitrogen bath and stored at -80°C.

For the biochemical analysis (Western Blotting), the different brain regions were defrosted and homogenized using 10 up-and down strokes of a prechilled teflon-glass homogenizer in 10 volumes of lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% (v/w) protease inhibitor, and 1% (v/v) phosphatase inhibitor cocktail. Then, lysates were sonicated for ten seconds and centrifuged 15,000g for 15 min at 4°C. The supernatants were collected and analyzed by fluorescence for protein concentrations using the protein assay kit Qubit® (Invitrogen, Fisher Scientific distributor, Illkirch, France) according to the manufacturer's protocol. Then, samples were frozen at -80°C until further analysis.

Immunoblotting

Samples (40 µg proteins) were prepared for electrophoresis by adding NuPAGE® 4X LDS sample buffer and NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X). Samples were then heat-denatured at 100°C for 5 min, loaded into Novex® 4-20% Tris-Glycine mini Gels, run at 150 V for 60 minutes in Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer and in NuPAGE® 3-8% Tris-Acetate Gels, run at 125 V for 120 minutes in NuPAGE® Tris-Acetate SDS running buffer containing NuPAGE antioxidant. Gels were transferred to nitrocellulose membranes using the iBlot® Dry blotting system set at 20 V for 7 min. For LC3 immunoblot, we used Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (25 V, 3 min for 0.2 µm nitrocellulose MISI format) after protein gel electrophoresis of samples prepared in 4X Laemmli sample buffer and loaded into 4-15% mini-PROTEAN® TGX™ gels with Tris-glycine SDS running buffer.

Membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline/Tween (TBST: 20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20) and non-specific antigenic sites were blocked by incubating the membranes in TBST containing 5% BSA for 2 h.

Blots were incubated with primary antibody in blocking buffer overnight at 4°C. Antibodies used were rabbit anti GFAP (Cell signaling, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France), goat anti Iba1 (Abcam, Cambrige, UK) anti bax (Cell signaling, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France), and anti NeuN (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), all diluted at 1:500. Membranes were washed twice with TBST and then incubated with the HRP-conjugated secondary anti-rabbit or anti-goat IgG antibody (1:1000), during 1 hour at room temperature. Membranes were washed again and exposed to the chemiluminescence Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) followed by signal's capture with the Gbox system (GeneSnap software, Syngene, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France). After 2 washes in TBST, membranes were probed with mouse antibody against actin (1:10000) overnight at 4°C. They were then washed with TBST, incubated with HRP-conjugated secondary antibody anti-mouse (1:1000) for 1 h, exposed to the chemiluminescence Luminata classico substrate (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and signals were captured. Automatic picture analysis software is supplied with Gene Tools (Syngene, Ozyme distributor, Montigny-le-Bretonneux, France). Ratios protein/actin were calculated and showed in the corresponding figures.

Data analysis

For EEG analysis, the different states of each implanted rat, i.e. active state, quiet wake state or REM (Rapid Eyes Movement) sleep and NREM (Non Rapid Eyes Movement) sleep, were determined from EEG and locomotor activity recorded by telemetry using an algorithm based on the publication of R.P. Louis (Louis et al., 2004). The effects of each treatment on the EEG bands power were analysis state by state and separately following the 12 hours light/dark cycle. The sleep architecture, i.e. the proportion of the REM and NREM sleep were also evaluated. Results were analysed using RS/1 software (release 6.0.1 BROOKS AUTOMATION, Lyon, France) by comparison with the vehicle group using an analysis of variance for repeated measurements with LSD (Least Square Difference) test in case of significance ($P \leq 0.05$).

For the behavioral analysis, the effects of each treatment on the error number as well as the swimming speed and the latency time were compared with the vehicle group using an analysis of variance for repeated measurements with Dunnett's test in case of significance ($P \leq 0.05$). The success rate was analyzed by comparison between each treatment using a FISHER's test.

For the results of immunoblotting, the effects of each treatment on the tested parameters were compared with the vehicle group using a Kruskal-Wallis test followed by non-parametric Mann-Whitney U test in case of significance ($P \leq 0.05$).

Results

Histological observations

A qualitative assessment of the different lesions in the rat brains induced by the administration of Abeta 42 peptide and/or AAV-Tau P301L was performed by immunohistochemistry. The pictures presented in figure 4 showed the different lesions found with each treatment. Amyloid deposits were observed in the Abeta and Abeta-Tau group three months after administration (figure 4 A). This observation demonstrated that the soluble Abeta 42 peptide is not eliminated in the rat brain and is able to aggregate *in vivo*. In the Tau and Abeta-Tau group, phosphorylated Tau on serine 396/404 was stained in the cytoplasm of several cells present in the hippocampus (figure 4 B). These finding demonstrated that an injection of AAV-Tau P301L in the rat brain induced an accumulation of hyperphosphorylated Tau, and reproduce a Tau pathology. These two different lesions (amyloid deposits and hyperphosphorylated Tau) were not observed in the other brain regions.

EEG assessment

The figure 5 reports the results of EEG recordings obtained during the eighth week after injection on a period of 24 hours. We have chosen to present only the eighth week because it's an intermediary time (EEG recordings performed from the third week up to the twelfth week) and because the changes of this parameter were similar along the EEG recording period.

Each treatment induced an overall decrease of the EEG bands power (figure 5 A,B and C) but no significant change in the sleep architecture, i.e. the proportion of REM sleep or NREM sleep. Only a slight decrease of the NREM sleep was observed with the Abeta-Tau treatment (figure 5 D). However, in the rats treated by the Abeta peptide (Abeta and Abeta-Tau groups), the decrease observed in the EEG bands power was more important during the REM sleep and particularly with the theta band. This effect was not observed with the Tau group.

Behavioral assessment

In the RAWM task, no significant change was observed on the swimming speed (figure 6 A) and the latency time to find the platform (figure 6 B), three months after the injections. Only the number of errors in this task revealed several differences between groups. The main effect observed was on the working memory errors (figure 6 C). Indeed, the Abeta-Tau treatment produced a statistically significant increase in error rate of re-entries from the session 5 up to the session 8 (P=0.040, 0.010, 0.012 and 0.008 respectively). Likewise, Tau treatment alone or Abeta treatment alone produced also a similar effect on this parameter, but less important than the Abeta-Tau treatment (significant from the session 6 up to the session 8 with Tau, P=0.023, 0.044 and 0.048 respectively) and not statistically significant with Abeta. A more important heterogeneity was noted within the Abeta group relative to the other groups explaining the difference observed between Abeta and Tau group on the statistical analysis results (mean and SEM for the session 8 on the working memory errors: Vehicle group: 10.9 ± 1.6; Abeta group: 15.8 ± 3.7, P>0.05; Tau group: 15.5 ± 2.9, P<0.05; Abeta-Tau group: 17.3 ± 2.9, P<0.01). Otherwise, Abeta treatment (Abeta alone or Abeta-Tau) induced a significant increase (P= 0.034 for Abeta group and P=0.001 for Abeta-tau group) in the reference memory errors (figure 6 D) in session 8, while Tau treatment had no effect on this parameter.

This result about the reference memory is confirmed by the test success rate (figure 7). Indeed, the increase, session by session, of this rate is less important with the Abeta treatment (Abeta and Abeta-Tau groups) than with Vehicle or Tau groups. This difference is significant for the session 8 between the Vehicle group and the Abeta-Tau group when compared with the Fisher's test.

In the probe test performed 24 hours after the last session, any difference was observed between each group (results not showed).

Immunoblotting

In the Western Blot analysis, a significant increase of the level of GFAP in the hippocampus was noted with the Abeta and Abeta-Tau treatment, whereas the Tau treatment had no effect on this parameter (figure 8 A). Besides, a significant increase of the level of NeuN was observed with the Tau treatment in the hippocampus (figure 8 C). No effect was noted on level of the microglial cell marker of Iba 1 (figure 8 B) and on the pro-apoptotic protein bax (figure 8 D) in the hippocampus and no change was observed on these parameters (GFAP, NeuN, Iba1 and bax) in the frontal and parietal cortex (results not shown).

Discussion

We have developed a new model of AD in the rat expressing the two histological hallmarks of AD (i.e. Abeta deposits and phosphorylated Tau). Indeed the injection of an AAV containing the human tau gene with mutation P301L in the rat brain allows the intracellular accumulation of phosphorylated Tau protein in the hippocampus. The time of three months after injections was chosen according to the paper of Ramirez (Ramirez et al., 2011) in which the authors described a working memory impairment induced by an injection in the entorhinal cortex of Sprague Dawley rats with the same vector and after three months. Moreover, an optimal expression of Tau (wild type) is described from seven weeks after injection in the hippocampus of Sprague Dawley rats with the same vector (Dayton et al., 2012). Moreover, the injection of soluble Abeta 1-42 peptide allows to reproduce the extracellular amyloid deposits. We have chosen the Abeta 1-42 because it's the most fibrillogenic form (Elder et al., 2010; Dahlgren et al., 2002). The soluble form is considered as more toxic than pre-aggregated peptide (fibrillary form) (Mucke and Selkoe, 2012; Dahlgren et al., 2002). Most of AD models using injection of soluble Abeta peptide, are focused only acute effects. Here, we have studied the long term effect of this treatment (three months after injection) and we have demonstrated that the peptide Abeta 1-42 is capable to aggregate in the rat brain and seems stable (not eliminated). These results are reinforced by the cognitive impairment observed after three months and by the sustainability of the EEG modifications in rats injected with Abeta 1-42.

The EEG analysis allowed assessment of potential brain functional disturbances during a large period after the injections of each treatment. The main effect observed which is common to the three treatments was an overall and permanent decrease of the power of the five EEG rhythms studied. This result suggests a disturbance of the rat brain recorded from the third week induced by the toxicity of the amyloid peptide and the accumulation of the phosphorylated Tau (see in histological slices). Curiously, we have not found any addition or synergy with the concomitant presence of these two lesions. Besides, we have found a difference between Tau-induced EEG changes and Abeta-induced EEG changes. Indeed, the rats receiving an Abeta intrahippocampal injection (Abeta and Abeta-Tau treatment) showed the largest decrease of their wave's power during the REM sleep state and particularly with the theta wave. In rats receiving the AAV-Tau intrahippocampal injection alone, there was no evident difference between the REM sleep changes and the other EEG modifications. The decrease of the theta band power was already described in several transgenic mouse models of

AD: mouse APP (Rubio et al., 2012) or APP/PS1 (Scott et al., 2012) and this decrease was associated with the first apparition of amyloid deposit in the hippocampus (Scott et al., 2012), or after an intrahippocampal injection of peptide amyloid (mix Abeta 1-40 and Abeta 1-42) in rat (Villette et al., 2010). But, currently, there is any preclinical studies exploring the effect of the tau pathology on EEG modifications. Architecture sleep changes were also described in transgenic mouse models of AD (Roh et al., 2012) with especially a decrease of the REM sleep (Zhang et al., 2005). In our AD model, we have not observed evident architecture sleep changes. We suppose that an architecture sleep disturbance requires lesions in a largest part of the brain. In the human AD, sleep disturbances appear in later steps and concern only 25-40% of cases depending on their severity (McCurry et al., 2000; Moran et al., 2005; Dauvilliers, 2007). However, in our model, the fact that the most EEG abnormalities appear during the REM sleep with Abeta treatment, demonstrates that amyloid deposits in the hippocampus induce, not a decrease of the REM sleep quantity, but a decrease of the REM sleep quality.

About the cognitive assessment, the first behavioral task used was a standard protocol of Morris water maze (Morris, 1984). However, no effect was observed during a preliminary study (data not shown). Then, we have chosen to develop a new protocol using a RAWM in order to increase the sensitivity (by addition of errors) and by discrimination of the working memory and the reference memory (Puzzo et al., 2014). The protocol used was inspired by a combination of working memory and reference memory procedures used in the Morris water maze. In the working memory procedure, the starting position is fixed and the platform is changed for each passage, in contrast to the reference memory procedure, in which the platform is fixed and the position start is moved before each passage (Ben et al., 2010; Morgan, 2009; Terry, 2009). Indeed, this new protocol was developed on the hypothesis that our AD model is more representative of a mild cognitive impairment (MCI) because brain damages were focalized only in the hippocampus (in opposition with a transgenic model). In the Braak and Braak stages (Braak and Braak, 1991), an hippocampal damage corresponds to the stage III. It's the first stage associated with the development of the memory impairment (Braak and Braak, 1997). This stage corresponds to a MCI before a conversion in Alzheimer dementia (stage V and VI). In the AD patients, the first clinical sign concerning the memory is a deficit of the learning capacity, and a forgetting of the recent events (Hodges, 1998) (Soto et al., 2007). In the animal models, lesions focalized in the hippocampus induce preferentially an impairment of the working memory (Aggleton et al., 1989; Becker et al., 1980; Murray et al., 2011).

Moreover, studies describe a deficit in spontaneous alternation (i.e. working memory impairment) in Sprague Dawley rats with an AAV-Tau treatment using a Y maze task (Ramirez et al., 2011; Mustroph et al., 2012) and no difference for the reference memory in a Morris water maze test (Dayton et al., 2012). In our study, the memory test developed allows to perform an assessment of these two specific memories. As expected, we have observed with the Tau group, an impairment of the spatial working memory but no effect in the spatial reference memory. So, we conclude, as in Ramirez and Mustroph's papers (Ramirez et al., 2011; Mustroph et al., 2012), that a Tau pathology localized only in the hippocampus induces a deficit in working memory, in opposition to the Abeta treatment (Abeta and Abeta-Tau groups) which induce also a reference memory impairment. Once again, like on EEG, we have noted a lack of additional effects with the presence of the two lesions on the memory parameter. The difference noted between Abeta and Tau treatment on the reference memory, may be ascribed to the REM sleep quality which presents no disturbance in the Tau group, contrary in the Abeta and Abeta-Tau group. Indeed, the REM sleep is considered as an important step in the consolidation of memory (Rodríguez-Vázquez et al., 2012) and this step would be depending on the hippocampus function with an increase of the theta wave generated by the hippocampus (Rodenbeck et al., 2006). For example, a REM sleep deprivation has shown a specific deficit of the reference memory in rodents using a radial arm maze task (close to our memory test) (Smith et al., 1998). Moreover, changes in the waves of REM and NREM sleeps, and most particularly with the theta waves, were described in patients with MCI, while they presented no change in the sleep architecture (Hot et al., 2011). For the authors, the modifications of theta waves during the sleep would be linked to the memory disturbances.

Few effects were observed with the biochemical analysis. The different treatments did not induce an increase of the pro-apoptotic marker studied (bax) and a decrease of the NeuN level (marker of neuronal nuclei). This lack of neuronal death confirms our hypothesis that we have developed a model more representative of early stages of AD. Only an astrogliosis was noted with the increase of GFAP level in rats treated with Abeta (Abeta and Abeta-Tau groups) even after three months post-injection. The pro-inflammatory effect of peptide Abeta 1-42 is well described in several animal models of AD (Puzzo et al., 2015; Richardson et al., 2002; Chacón et al., 2004). But we were surprised by the lack of gliosis with the Tau group. This lack of pro-inflammatory reaction was already observed in the rat, for example, with a transgenic model which overexpress the Tau protein with the P301L mutation (Korhonen et

al., 2011) or after an injection of a vector containing the tau P301L gene (Khandelwal et al., 2012). An explanation could be that astrocytes are transfected by the AAV9 and the expression of Tau protein would induce a deleterious effect on these astrocytes. Indeed, it has been observed that a transfection of an astrocytes culture with a recombinant adenovirus expressing the Tau 4R human induces a non-apoptotic death of this astrocytes (Yoshiyama et al., 2003). Another strange effect is observed with Tau treatment: the increase of NeuN level in comparison with vehicle group. We hypothesise that damages on hippocampus (induce by phosphorylated Tau) would induce a stimulation of the differentiation of stem cells in neurons. Indeed, a stock of stem cells has been described close to dentate gyrus (Kiyota et al., 2011).

The difference, on the astrogliosis, observed between Abeta treated groups and the Tau group, could explain the differences observed on the theta wave and on the reference memory. Indeed, several authors describe an important role of astrocytes in the formation and the restitution of a long term memory but not for the working memory (Lee et al., 2014) and the generation of theta rhythms in the hippocampus by release of several neuroactive substances as the glutamate (Hassanpoor et al., 2014).

The concomitant injection of soluble Abeta 42 peptide and an AAV-Tau allows to reproduce the two specific lesions in the first structures (hippocampus) impaired in the AD. But these two lesions do not seem to produce additional effects in the rat. However, amyloid deposits and phosphorylated Tau showed several different effects. These two lesions seem to produce a disruption of the hippocampus network but by different mechanisms. So, this Abeta-Tau co-injection constitutes an interesting model to assess a potential neuroprotective drug which would improve these two deleterious mechanisms. Moreover, the EEG analysis approach constitutes a good tool to evaluate any brain disturbances with a good sensitivity and the possibility to perform a follow up during a large period.

To conclude, our model of AD is the first model producing the two pathological features of AD in a non-transgenic rat and we are the first to describe a difference between the amyloid pathology and the tau pathology using an EEG analysis approach. Moreover, due to the results showing an impairment mainly in the working memory (first clinical signs in the AD) and a slight biochemical modification occurring only in the hippocampus (i.e. no changes in level of pro-apoptotic protein and no decrease of NeuN), we can assert that we dispose of a model more representative of the earlier stages of AD (as a mild cognitive impairment). After

the failure of the majority of current therapies in clinic, one of future challenges is to develop new therapeutic approaches targeting earlier stages of the disease and taking in consideration the interactions between Abeta and Tau. So, our AD model could represent a good alternative to transgenic models in the assessment of potential neuroprotective therapies.

Funding and disclosure: the authors declare no conflict of interest

Acknowledgments: the authors would like to thank Damien Chassaing for his skillful assistance in western blot analysis.

References:

Aggleton JP, Blindt HS, Rawlins JN (1989). Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. *Behav Neurosci* **103**: 962–974.

Becker JT, Walker JA, Olton DS (1980). Neuroanatomical bases of spatial memory. *Brain Res* **200**: 307–320.

Ben J, Soares FMS, Scherer EBS, Cechetti F, Netto CA, Wyse ATS (2010). Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. *Neurobiol Learn Mem* **94**: 312–317.

Braak H, Braak E (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl.)* **82**: 239–259.

Braak H, Braak, E (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* **18**: 351–357.

Braidy N, Muñoz P, Palacios AG, Castellano-Gonzalez G, Inestrosa NC, Chung RS *et al* (2012). Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *J Neural Transm* **119**: 173–195.

Do Carmo S, Cuello AC (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener* **8**: 37.

Chacón MA, Barría MI, Soto C, Inestrosa NC (2004). Beta-sheet breaker peptide prevents Abeta-induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits. *Mol Psychiatry* **9**: 953–961.

Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* **277**: 32046–32053.

Dauvilliers Y (2007). Insomnia in patients with neurodegenerative conditions. *Sleep Med* **Suppl 4**: S27–S34.

Dayton RD, Wang DB, Cain CD, Schrott LM, Ramirez JJ, King MA, *et al* (2012). Frontotemporal lobar degeneration-related proteins induce only subtle memory-related deficits when bilaterally overexpressed in the dorsal hippocampus. *Exp Neurol* **233**: 807–814.

Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **115**: 5–38.

Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R (2010). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 69–81.

Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S *et al* (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**: 493–521.

Grasing K, Szeto H (1992). Diurnal variation in continuous measures of the rat EEG power spectra. *Physiol Behav* **51**: 249–254.

Hassanpoor H, Fallah A, Raza M (2014). Mechanisms of hippocampal astrocytes mediation of spatial memory and theta rhythm by gliotransmitters and growth factors. *Cell Biol Int* **38**: 1355–1366.

Hodges J (1998). The amnestic prodrome of Alzheimer's disease. *Brain J Neurol 121:* 1601–1602.

Hot P, Rauchs G, Bertran F, Denise P, Desgranges B, Clochon P *et al* (2011). Changes in sleep theta rhythm are related to episodic memory impairment in early Alzheimer's disease. *Biol Psychol* **87**: 334–339.

Jacob HJ, Kwitek AE (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* **3**: 33–42.

Kay C, Harper DN, Hunt M (2010). Differential effects of MDMA and scopolamine on working versus reference memory in the radial arm maze task. *Neurobiol Learn Mem* **93**: 151–156.

Khandelwal PJ, Dumanis SB, Herman AM, Rebeck GW, Moussa CEH (2012). Wild type and P301L mutant Tau promote neuro-inflammation and α-Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models. *Mol Cell Neurosci* **49**: 44–53.

Kiyota T, Ingraham KL, Jacobsen MT, Xiong H, Ikezu T (2011). FGF2 gene transfer restores hippocampal functions in mouse models of Alzheimer's disease and has therapeutic implications for neurocognitive disorders. Proc Natl Acad Sci USA **108**: E1339–E1348.

Klein RL, Dayton RD, Lin WL, Dickson DW (2005). Tau gene transfer, but not alpha-synuclein, induces both progressive dopamine neuron degeneration and rotational behavior in the rat. *Neurobiol Dis* **20**: 64-73.

Klein RL, Dayton RD, Leidenheimer NJ, Jansen K, Golde TE, Zweig RM (2006). Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther* **13**: 517-527.

Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Diaczynsky CG, Salvatore MF (2008). Tau expression levels from various adeno-associated virus vector serotypes produce graded neurodegenerative disease states. *Eur J Neurosci* **27**: 1615-1625.

Korhonen P, van Groen T, Thornell A, Kyrylenko S, Soininen ML, Ojala J et al (2011). Characterization of a novel transgenic rat carrying human tau with mutation P301L. *Neurobiol Aging* **32**: 2314–2315.

Laurijssens B, Aujard F, Rahman A (2013). Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discov Today Technol* **10**: e319–e327.

Lee HS, Ghetti A, Pinto-Duarte A, Wang X, Dziewczapolski G, Galimi F (2014). Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: E3343–E3352.

Lin JH (1995). Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **23**: 1008–1021.

Louis RP, Lee J, Stephenson R (2004). Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J Neurosci Methods* **133**: 71–80.

Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* **706**: 181-193.

McCurry SM, Reynolds CF, Ancoli-Israel S, Teri L, Vitiello MV (2000). Treatment of sleep disturbance in Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev* **4**: 603–628.

Moran M, Lynch CA, Walsh C, Coen R, Coakley D, Lawlor BA (2005). Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. *Sleep Med* **6**: 347–352.

Morgan D (2009). Water maze tasks in mice: special reference to Alzheimer's transgenic mice. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, Buccafusco JJ, ed. CRC Press: Boca Raton, FL.

Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* **11**: 47–60.

Mucke L, Selkoe DJ (2012). Neurotoxicity of amyloid β-protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006338.

Murray AJ, Sauer JF, Riedel G, McClure C, Ansel L, Cheyne L *et al* (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nat Neurosci* **14**: 297–299.

Mustroph ML, King MA, Klein RL, Ramirez JJ (2012). Adult-onset focal expression of mutated human tau in the hippocampus impairs spatial working memory of rats. *Behav Brain Res* **233**: 141–148.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kayed R *et al* (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**: 409–421.

Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* **88**: 450–467.

Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **10**: 703–711.

Ramirez JJ, Poulton WE, Knelson E, Barton C, King MA, Klein, RL (2011). Focal expression of mutated tau in entorhinal cortex neurons of rats impairs spatial working memory. *Behav Brain Res* **216**: 332–340.

Richardson RL, Kim EM, Shephard RA, Gardiner T, Cleary J, O'Hare E (2002). Behavioural and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated Abeta(1-42) injections in the rat. *Brain Res* **954**: 1–10.

Rodenbeck A, Binder R, Geisler P, Danker-Hopfe H, Lund R, Raschke F *et al* (2006). A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition according to Rechtschaffen and Kales. *Somnologie* **10**: 159–175.

Rodríguez-Vázquez J, Camacho-Arroyo I, Velázquez-Moctezuma J (2012). Differential impact of REM sleep deprivation on cytoskeletal proteins of brain regions involved in sleep regulation. *Neuropsychobiology* **65**: 161–167.

Roh JH, Huang Y, Bero AW, Kasten T, Stewart FR, Bateman RJ *et al* (2012). Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β-amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. *Sci Transl Med* **4**: 150ra122.

Rubio SE, Vega-Flores G, Martínez A, Bosch C, Pérez-Mediavilla A, del Río J *et al* (2012). Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**: 4458–4467.

Scott L, Feng J, Kiss T, Needle E, Atchison K, Kawabe TT *et al* (2012). Age-dependent disruption in hippocampal θ oscillation in amyloid-β overproducing transgenic mice. *Neurobiol Aging* **33**: 1481.e13–e23.

Smith CT, Conway JM, Rose GM (1998). Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task. *Neurobiol Learn Mem* **69**: 211–217.

Soto M, Reynish E, Nourhashémi F, Vellas B (2007). [Clinical aspects of Alzheimer disease]. *Presse Med* **36**: 1491–1499.

Spires TL, Hyman BT (2005). Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* **2**: 423–437.

Terry AV (2009). Spatial navigation (water maze) tasks. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, Buccafusco JJ, ed. CRC Press: Boca Raton, FL.

Urani A, Romieu P, Roman FJ, Maurice T (2002). Enhanced antidepressant effect of sigma(1) receptor agonists in beta(25-35)-amyloid peptide-treated mice. *Behav Brain Res* **134**: 239–247.

Villette V, Poindessous-Jazat F, Simon A, Léna C, Roullot E, Bellessort B, et al (2010). Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. *J Neurosci* **30**: 10991–11003.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* **5**: 88.

Yoshiyama Y, Zhang B, Bruce J, Trojanowski JQ, Lee VMY (2003). Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J Neurosci* **23**: 10662–10671.

Zhang B, Veasey SC, Wood MA, Leng LZ, Kaminski C, Leight S et al (2005). Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. *Am J Pathol* **167**: 1361–1369.

Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G et al (2011). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *Am J Pathol* **179**: 315–334.

Figure Legends:

Figure 1: Design of the different experiments. **W**: week

Figure 2: Schematic representation and procedure used in the RAWM task for the memory assessment.

Figure 3: Implantation of the two EEG electrodes in the rat skull. Figure adapted from the stereotaxic atlas of the rat brain of Paxinos and Watson.

Figure 4: Representative sections of hippocampus showing the two different lesions, i.e. amyloid deposits (**A**) and phosphorylated Tau on serine 396/404 (**B**), labeled with DAPI for the nuclei staining, WO2 antibody for the amyloid deposits staining and PHF1 antibody for the phosphorylated Tau staining.

Figure 5: Effect of different treatments (Abeta, Tau and Abeta-Tau) on the EEG bands power and the sleep architecture. **A**-**C**, EEG bands changes observed for each group in comparison with the Vehicle group and expressed in term of variation (%) in four states : active (red bars), quiet wake (purple bars), NREM sleep (cyan bars) and REM sleep (blue bars). Results of the night or daylight periods are also presented separately: for each band, the left bar represent the daylight period and the right bar represent the night period. **D**, sleep architecture expressed in proportion (%, ± SEM) of NREM sleep (left graph) and REM sleep (right graph). Results were expressed in term of variation (%) and analysed using an ANOVA for repeated measurements with the LSD test in case of significance ($P \leq 0,05$). Vehicle group n=7, Abeta group n=5, Tau group n=5, Abeta-Tau group n=7. *: P<= 0.05, **: P<= 0.01 when compared to the Vehicle group.

Figure 6: Effect of different treatments (Abeta, Tau and Abeta-Tau) on memory and locomotor activity in a RAWM task. These curves were expressed in mean values (± SEM) cumulated session by session for each group (n=12 for each group). Results were analysed by comparison with the Vehicle group using an ANOVA for repeated measurements with Dunnett's test in case of significance ($P \leq 0.05$). A, results of the swimming speed expressed in cm/second. B, latency time values showing the total time (in seconds) performed by rats through three trials (one session) to find the three platforms. C, working memory errors expressed in term of total re-entries committed by rats through three trials (one session). D, reference memory errors expressed in term of total first visit in the error arms (never with

platform and different from the start arm) through three trials (one session) and increased by a coefficient depending of the number of session. *: P<= 0.05, **: P<= 0.01 when compared to the Vehicle group.

Figure 7: Assessment of learning with a test success criterion based on the reference memory error. A rate for each group has been calculated in adding session by session the number (%) of rats which finished a session in committing a maximum of one reference memory error (i.e. a maximum of one entry in an error arm within three trials). Results were analysed by comparison with the Vehicle group using a Fisher's test. *: P<= 0.05 when compared to the Vehicle group

Figure 8: Effect of the different treatment on the levels of GFAP (**A**), Iba1 (**B**), NeuN (**C**) and bax (**D**) in hippocampus from each group of rats by western-blotting. The results showed, were expressed in term of median (n=6-8 for each group). Results were analysed by comparison with the Vehicle group using a Kruskal-Wallis test followed by non-parametric Mann-Whitney U test in case of significance ($P \leq 0.05$). *: P<= 0.05 when compared to the Vehicle group.

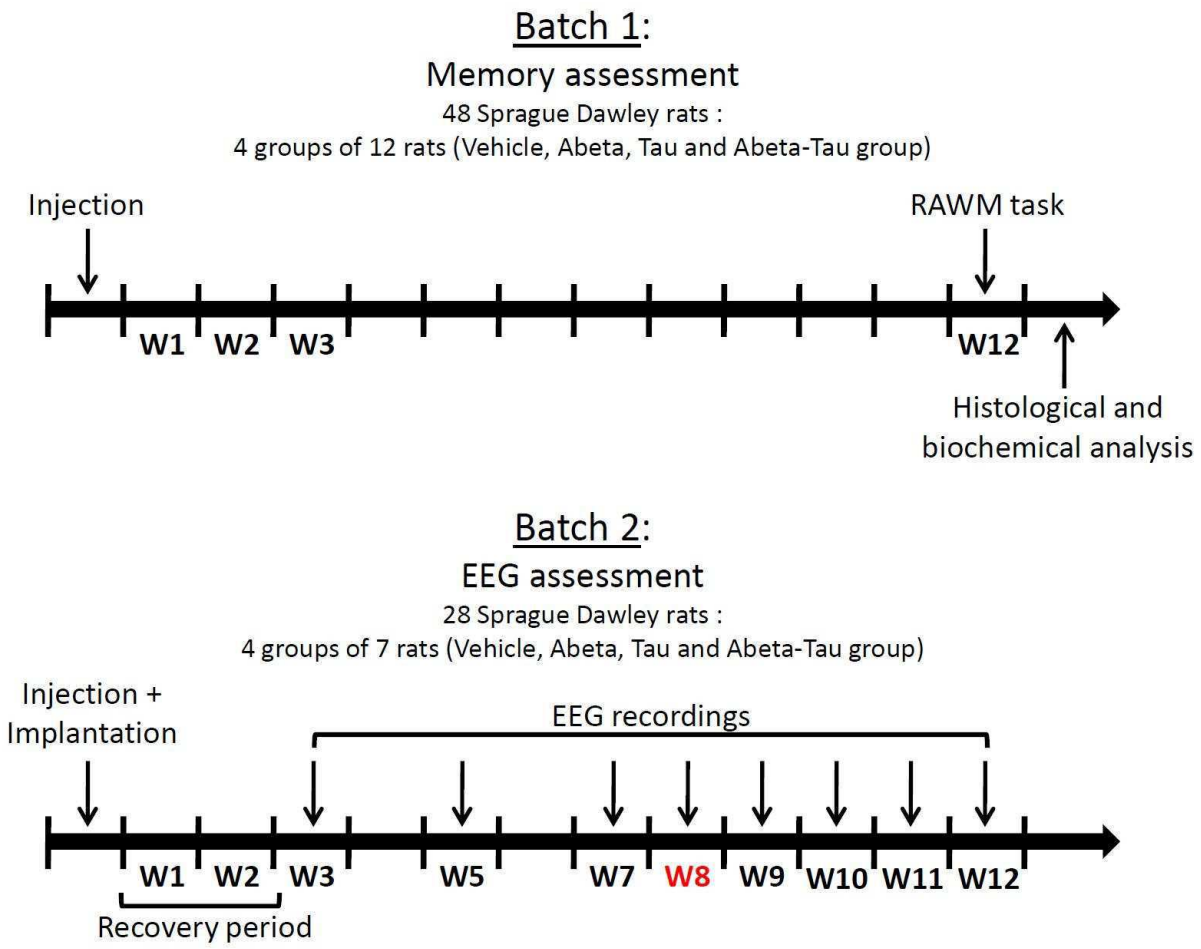

Batch 1:
Memory assessment
48 Sprague Dawley rats :
4 groups of 12 rats (Vehicle, Abeta, Tau and Abeta-Tau group)
Injection
RAWM task
W1
W2
W3
W12
Histological and
biochemical analysis
Batch 2:
EEG assessment
28 Sprague Dawley rats :
4 groups of 7 rats (Vehicle, Abeta, Tau and Abeta-Tau group)
Injection +
Implantation
EEG recordings
W1
W2
W3
W5
W7
W8
W9
W10
W11
W12
Recovery period

Fig 1

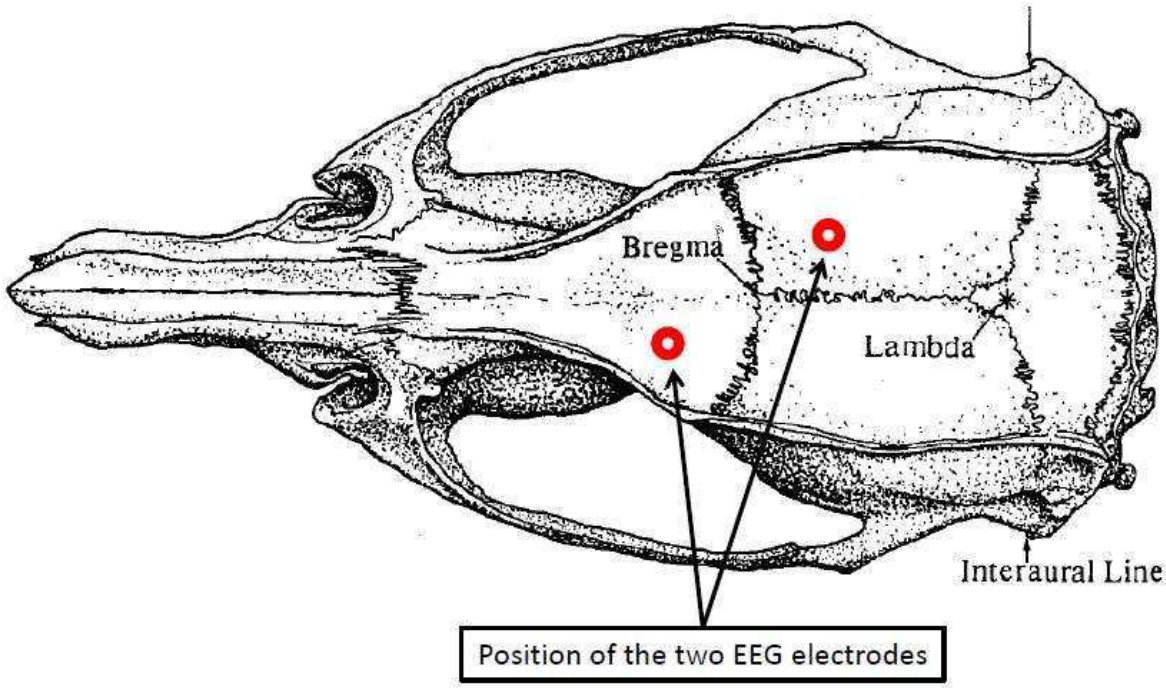

Bregma
Lambda
Interaural Line
Position of the two EEG electrodes

Fig 2

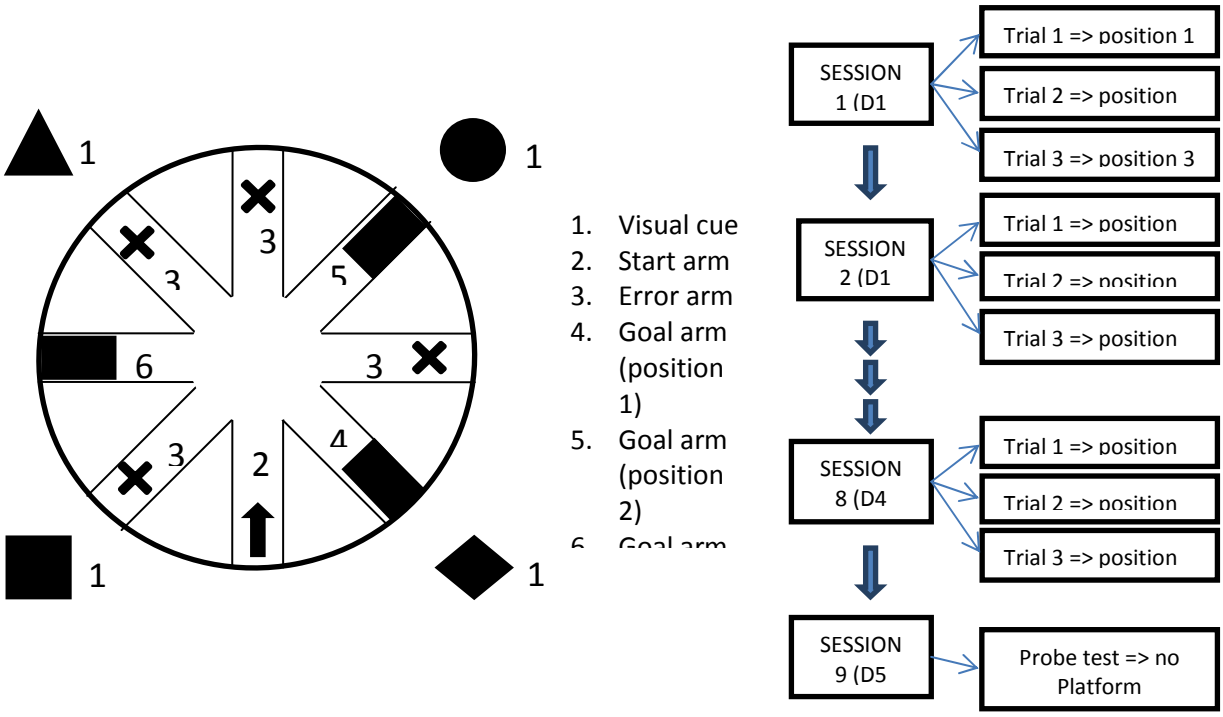

1
1
1
1
3
3
5
6
3
3
2
4
1. Visual cue
2. Start arm
3. Error arm
4. Goal arm (position 1)
5. Goal arm (position 2)
SESSION 1 (D1
Trial 1 => position 1
Trial 2 => position
Trial 3 => position 3
SESSION 2 (D1
Trial 1 => position
Trial 2 => position
Trial 3 => position
SESSION 8 (D4
Trial 1 => position
Trial 2 => position
Trial 3 => position
SESSION 9 (D5
Probe test => no Platform

Fig 3

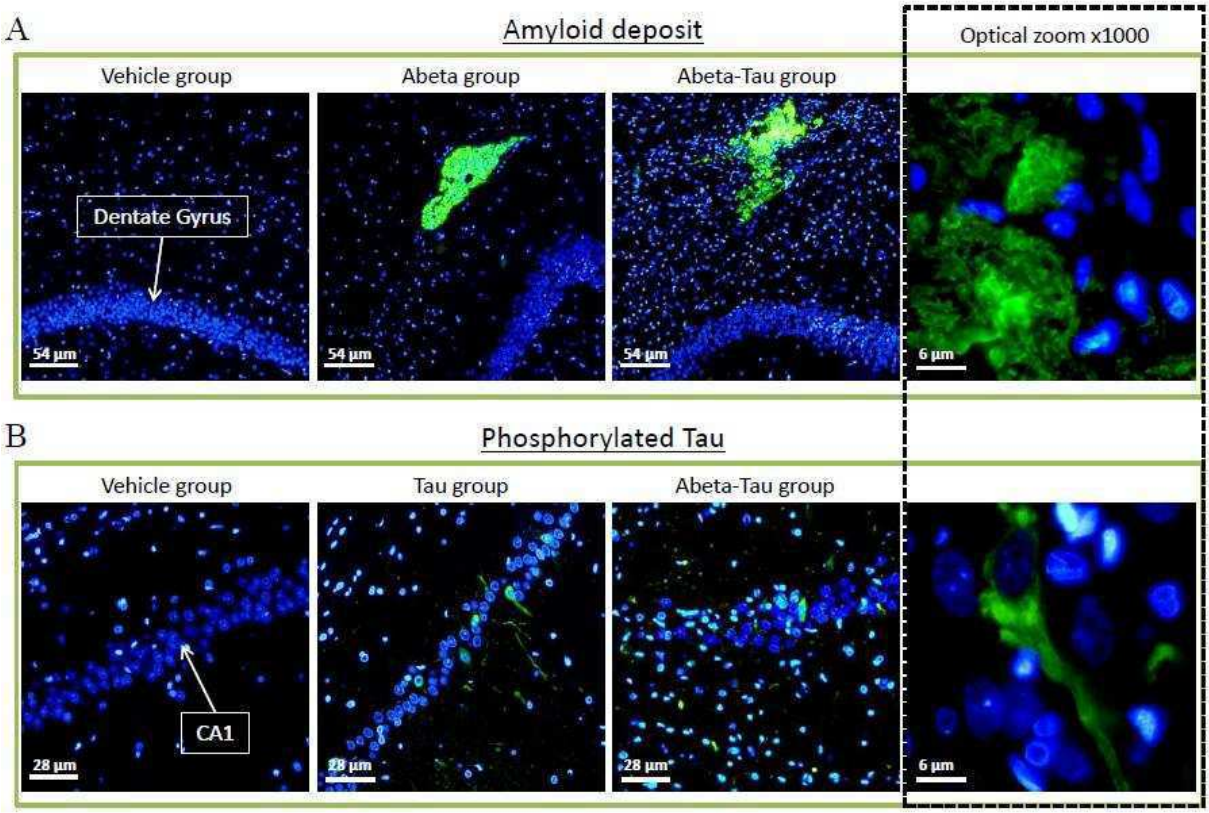

A
Amyloid deposit
Optical zoom x1000
Vehicle group
Abeta group
Abeta-Tau group
Dentate Gyrus
54 µm
54 µm
54 µm
6 µm
B
Phosphorylated Tau
Vehicle group
Tau group
Abeta-Tau group
CA1
28 µm
28 µm
28 µm
6 µm

Fig 4

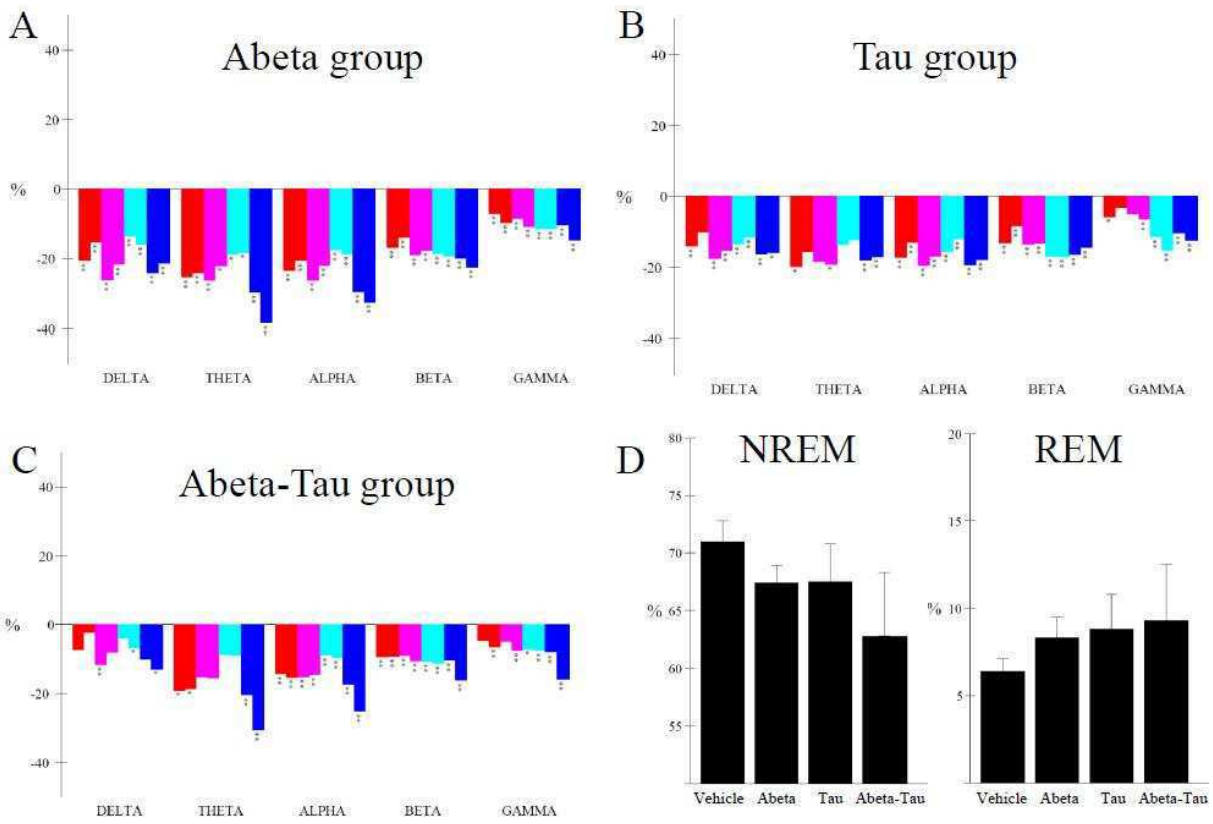

A
Abeta group
B
Tau group
C
Abeta-Tau group
D
NREM
REM
%
DELTA
THETA
ALPHA
BETA
GAMMA
Vehicle
Abeta
Tau
Abeta-Tau

Fig 5

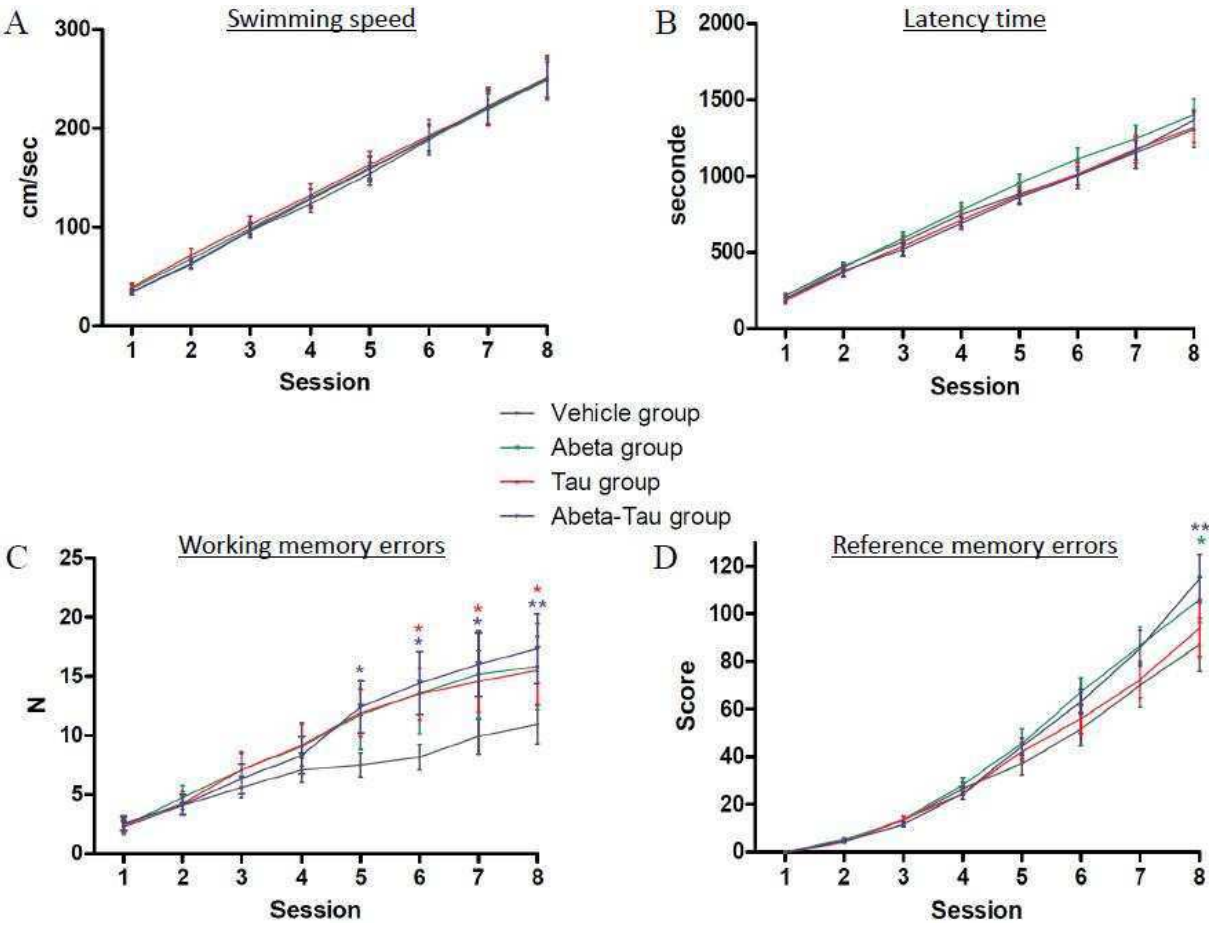

A
Swimming speed
cm/sec
Session
B
Latency time
seconde
Session
Vehicle group
Abeta group
Tau group
Abeta-Tau group
C
Working memory errors
N
Session
D
Reference memory errors
Score
Session

Fig 6

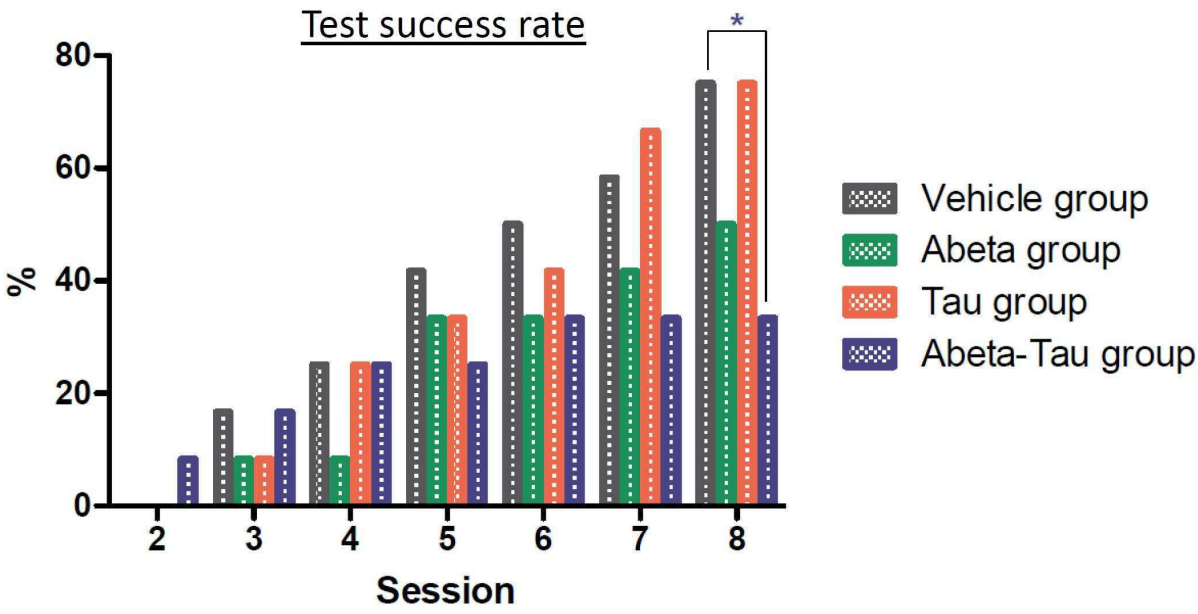

Test success rate
*
80
60
40
20
0
%
2
3
4
5
6
7
8
Session
Vehicle group
Abeta group
Tau group
Abeta-Tau group

Fig 7

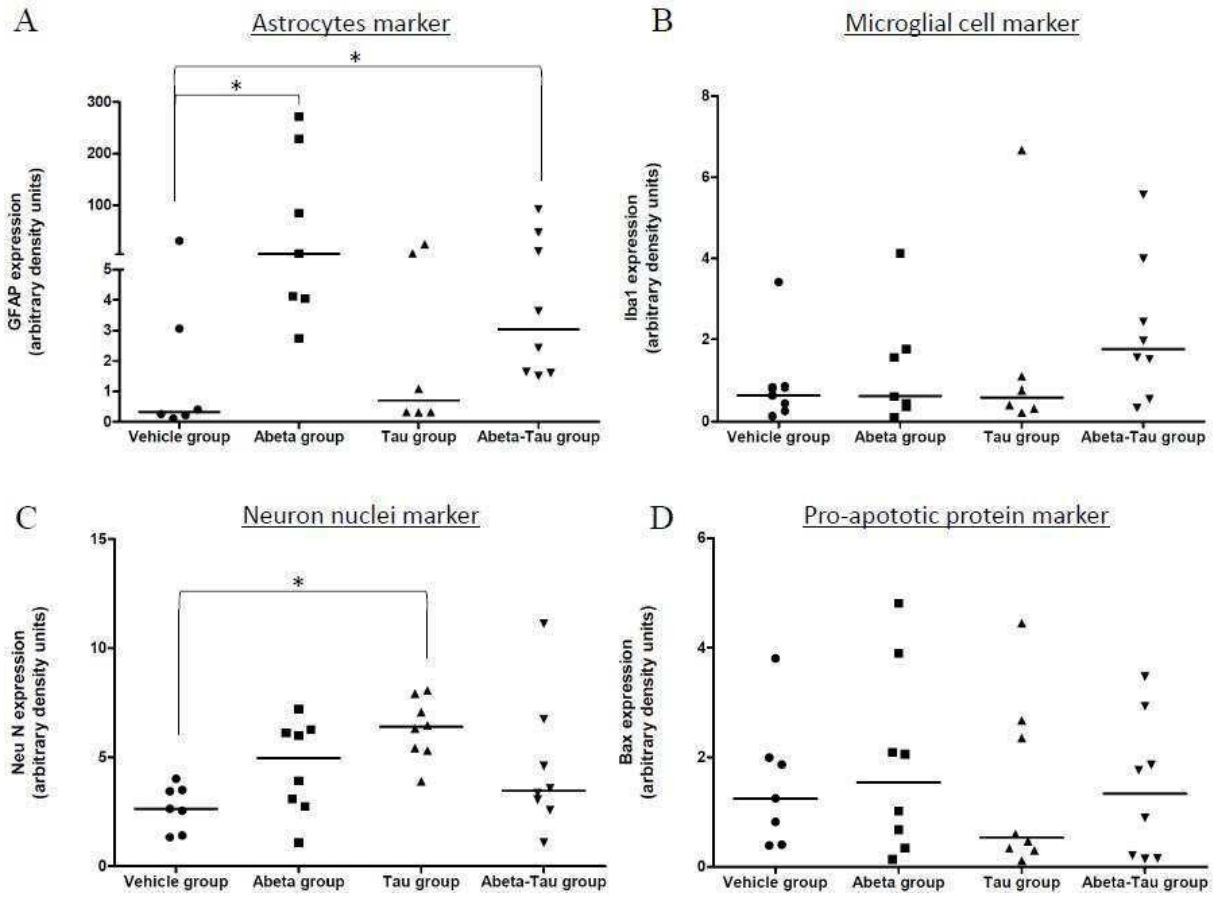

A
Astrocytes marker
GFAP expression
(arbitrary density units)
Vehicle group
Abeta group
Tau group
Abeta-Tau group
B
Microglial cell marker
Iba1 expression
(arbitrary density units)
C
Neuron nuclei marker
Neu N expression
(arbitrary density units)
D
Pro-apototic protein marker
Bax expression
(arbitrary density units)

Fig 8

Partie 5 : Références bibliographiques

Abdel-Aal, R.A., Assi, A.-A.A., and Kostandy, B.B. (2011). Memantine prevents aluminum-induced cognitive deficit in rats. Behav. Brain Res. *225*, 31–38.

Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G.D., Ruff, E., and Slutsky, I. (2009). Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. Nat. Neurosci. *12*, 1567–1576.

Aggleton, J.P., Blindt, H.S., and Rawlins, J.N. (1989). Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. Behav. Neurosci. *103*, 962–974.

Ahn, K., Shelton, C.C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M.L., Sisodia, S.S., and Li, Y.-M. (2010). Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 21435–21440.

Akiyama, H., Hosokawa, M., Kametani, F., Kondo, H., Chiba, M., Fukushima, M., and Tabira, T. (2012). Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in AβPP and AβPP/tau transgenic mice. Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol. *32*, 390–397.

Alamed, J., Wilcock, D.M., Diamond, D.M., Gordon, M.N., and Morgan, D. (2006). Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. Nat. Protoc. *1*, 1671–1679.

Amador-Arjona, A., Elliott, J., Miller, A., Ginbey, A., Pazour, G.J., Enikolopov, G., Roberts, A.J., Terskikh, A.V. (2011). Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. J. Neurosci. *31*, 9933–9944.

Amador-Ortiz, C., Lin, W.-L., Ahmed, Z., Personett, D., Davies, P., Duara, R., Graff-Radford, N.R., Hutton, M.L., and Dickson, D.W. (2007). TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. Ann. Neurol. *61*, 435–445.

Amatniek, J.C., Hauser, W.A., DelCastillo-Castaneda, C., Jacobs, D.M., Marder, K., Bell, K., Albert, M., Brandt, J., and Stern, Y. (2006). Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. Epilepsia *47*, 867–872.

Anderton, B.H. (1997). Changes in the ageing brain in health and disease. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *352*, 1781–1792.

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K.L., Barde, Y.-A., Duff, K., and Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. J. Neurochem. *86*, 582–590.

Andrea, M.R. D', and Nagele, R.G. (2010). Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer's disease pathogenesis. Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm. *85*, 133–147.

Antequera, D., Bolos, M., Spuch, C., Pascual, C., Ferrer, I., Fernandez-Bachiller, M.I., Rodríguez-Franco, M.I., and Carro, E. (2012). Effects of a tacrine-8-hydroxyquinoline hybrid (IQM-622) on Aβ accumulation and cell death: involvement in hippocampal neuronal loss in Alzheimer's disease. Neurobiol. Dis. *46*, 682–691.

Aoki, M., Volkmann, I., Tjernberg, L.O., Winblad, B., and Bogdanovic, N. (2008). Amyloid beta-peptide levels in laser capture microdissected cornu ammonis 1 pyramidal neurons of Alzheimer's brain. Neuroreport *19*, 1085–1089.

Arab, L., Sadeghi, R., Walker, D.G., Lue, L.-F., and Sabbagh, M.N. (2011). Consequences of Aberrant Insulin Regulation in the Brain: Can Treating Diabetes be Effective for Alzheimer's Disease. Curr. Neuropharmacol. *9*, 693–705.

Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Tsuchiya, K., Iritani, S., Ishiguro, K., Yagishita, S., Oda, T., Odawara, T., and Iseki, E. (2003). Different immunoreactivities of the microtubule-binding region of tau and its molecular basis in brains from patients with Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. Acta Neuropathol. (Berl.) *105*, 489–498.

Arendash, G.W., Sanchez-Ramos, J., Mori, T., Mamcarz, M., Lin, X., Runfeldt, M., Wang, L., Zhang, G., Sava, V., Tan, J., et al. (2010). Electromagnetic field treatment protects against and reverses cognitive impairment in Alzheimer's disease mice. J. Alzheimers Dis. JAD *19*, 191–210.

Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., and Bennett, D.A. (2004). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. Arch. Neurol. *61*, 661–666.

Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L., and Sutherland, R.J. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. Behav. Brain Res. *132*, 77–84.

Atamna, H., Frey, W.H., and Ko, N. (2009). Human and rodent amyloid-beta peptides differentially bind heme: relevance to the human susceptibility to Alzheimer's disease. Arch. Biochem. Biophys. *487*, 59–65.

Atkinson, R.C., and Shiffrin, R.M. (1971). The control of short-term memory. Sci. Am. *225*, 82–90.

Aytan, N., Choi, J.-K., Carreras, I., Kowall, N.W., Jenkins, B.G., and Dedeoglu, A. (2013). Combination therapy in a transgenic model of Alzheimer's disease. Exp. Neurol. *250*, 228–238.

Baddeley, A. (1992). Working memory. Science *255*, 556–559.

Barilar, J.O., Knezovic, A., Grünblatt, E., Riederer, P., and Salkovic-Petrisic, M. (2015). Nine-month follow-up of the insulin receptor signalling cascade in the brain of streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *122*, 565–576.

Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol. *93*, 74–104.

Del Barrio, L., Martín-de-Saavedra, M.D., Romero, A., Parada, E., Egea, J., Avila, J., McIntosh, J.M., Wonnacott, S., and López, M.G. (2011). Neurotoxicity induced by okadaic acid in the human neuroblastoma SH-SY5Y line can be differentially prevented by α7 and β2* nicotinic stimulation. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. *123*, 193–205.

Barrow, C.J., Yasuda, A., Kenny, P.T., and Zagorski, M.G. (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. J. Mol. Biol. *225*, 1075–1093.

Bayer, T.A., and Wirths, O. (2010). Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. *2*, 8.

Becker, J.T., Walker, J.A., and Olton, D.S. (1980). Neuroanatomical bases of spatial memory. Brain Res. *200*, 307–320.

Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., and Turner, A.J. (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep. *10*, 94–100.

Ben, J., Soares, F.M.S., Scherer, E.B.S., Cechetti, F., Netto, C.A., and Wyse, A.T.S. (2010). Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. Neurobiol. Learn. Mem. *94*, 312–317.

Berns, K.I., and Linden, R.M. (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *17*, 237–245.

Bertoni-Freddari, C., Sensi, S.L., Giorgetti, B., Balietti, M., Di Stefano, G., Canzoniero, L.M.T., Casoli, T., and Fattoretti, P. (2008). Decreased presence of perforated synapses in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Rejuvenation Res. *11*, 309–313.

Bi, X., Gall, C.M., Zhou, J., and Lynch, G. (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. Neuroscience *112*, 827–840.

Binder, S., Baier, P.C., Mölle, M., Inostroza, M., Born, J., and Marshall, L. (2012). Sleep enhances memory consolidation in the hippocampus-dependent object-place recognition task in rats. Neurobiol. Learn. Mem. *97*, 213–219.

Blanchard, B.J., Chen, A., Rozeboom, L.M., Stafford, K.A., Weigele, P., and Ingram, V.M. (2004). Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 14326–14332.

Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature *361*, 31–39.

Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. *232*, 331–356.

Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., and Krause, K.-H. (2006). Microcebus murinus: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? Genes Brain Behav. *5*, 120–130.

Book, A.A., Wiley, R.G., and Schweitzer, J.B. (1992). Specificity of 192 IgG-saporin for NGF receptor-positive cholinergic basal forebrain neurons in the rat. Brain Res. *590*, 350–355.

Borbély, E., Horváth, J., Furdan, S., Bozsó, Z., Penke, B., and Fülöp, L. (2014). Simultaneous changes of spatial memory and spine density after intrahippocampal administration of fibrillar aβ1-42 to the rat brain. BioMed Res. Int. *2014*, 345305.

Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., et al. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. Neuron *17*, 1005–1013.

Bores, G.M., Huger, F.P., Petko, W., Mutlib, A.E., Camacho, F., Rush, D.K., Selk, D.E., Wolf, V., Kosley, R.W., Davis, L., et al. (1996). Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. J. Pharmacol. Exp. Ther. *277*, 728–738.

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. (Berl.) *82*, 239–259.

Braak, H., and Braak, E. (1996). Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. Acta Neuropathol. (Berl.) *92*, 197–201.

Braak, H., and Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. Neurobiol. Aging *18*, 351–357.

Braak, H., and Del Tredici, K. (2004). Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. Neurobiol. Aging *25*, 713–718; discussion 743–746.

Braak, H., Braak, E., and Strothjohann, M. (1994). Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. Neurosci. Lett. *171*, 1–4.

Braak, H., Rüb, U., Schultz, C., and Del Tredici, K. (2006). Vulnerability of cortical neurons to Alzheimer's and Parkinson's diseases. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 35–44.

Braidy, N., Muñoz, P., Palacios, A.G., Castellano-Gonzalez, G., Inestrosa, N.C., Chung, R.S., Sachdev, P., and Guillemin, G.J. (2012). Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *119*, 173–195.

Braidy, N., Poljak, A., Jayasena, T., Mansour, H., Inestrosa, N.C., and Sachdev, P.S. (2015). Accelerating Alzheimer's research through "natural" animal models. Curr. Opin. Psychiatry *28*, 155–164.

Brion, J.-P. (2006). Immunological demonstration of tau protein in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 177–185.

Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., and Flament-Durand, J. (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. J. Submicrosc. Cytol. *17*, 89–96.

Brodziak, A., Kołat, E., Różyk-Myrta, A. (2014). In search of memory tests equivalent for experiments on animals and humans. Med. Sci. Monit. *20*, 2733–2739.

Bryan, K.J., Lee, H., Perry, G., Smith, M.A., and Casadesus, G. (2009). Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, J.J. Buccafusco, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press),.

Buée, L., and Delacourte, A. (2006). [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil. *4*, 261–273.

Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Res. Brain Res. Rev. *33*, 95–130.

Buée, L., Troquier, L., Burnouf, S., Belarbi, K., Van der Jeugd, A., Ahmed, T., Fernandez-Gomez, F., Caillierez, R., Grosjean, M.-E., Begard, S., et al. (2010). From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? Biochem. Soc. Trans. *38*, 967–972.

Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. Neuron *33*, 325–340.

Buzsáki, G., and Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. Science *304*, 1926–1929.

Caillierez, R., Bégard, S., Lécolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., Loyens, A., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., et al. (2013). Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *21*, 1358–1368.

Calenda, A., Mestre-Francés, N., Czech, C., Pradier, L., Petter, A., Perret, M., Bons, N., and Bellis, M. (1998). Cloning of the presenilin 2 cDNA and its distribution in brain of the primate, Microcebus murinus: coexpression with betaAPP and Tau proteins. Neurobiol. Dis. *5*, 323–333.

Calhoun, M.E., Burgermeister, P., Phinney, A.L., Stalder, M., Tolnay, M., Wiederhold, K.H., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Sommer, B., Staufenbiel, M., et al. (1999). Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 14088–14093.

Campbell, I.G., Guinan, M.J., and Horowitz, J.M. (2002). Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. J. Neurophysiol. *88*, 1073–1076.

Cao, C., Cirrito, J.R., Lin, X., Wang, L., Wang, L., Verges, D.K., Dickson, A., Mamcarz, M., Zhang, C., Mori, T., et al. (2009). Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. J. Alzheimers Dis. JAD *17*, 681–697.

Carmignoto, G., and Fellin, T. (2006). Glutamate release from astrocytes as a non-synaptic mechanism for neuronal synchronization in the hippocampus. J. Physiol. Paris *99*, 98–102.

Do Carmo, S., and Cuello, A.C. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. Mol. Neurodegener. *8*, 37.

Carreras, I., McKee, A.C., Choi, J.-K., Aytan, N., Kowall, N.W., Jenkins, B.G., and Dedeoglu, A. (2013). R-flurbiprofen improves tau, but not Aß pathology in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. Brain Res. *1541*, 115–127.

Carty, N., Nash, K.R., Brownlow, M., Cruite, D., Wilcock, D., Selenica, M.-L.B., Lee, D.C., Gordon, M.N., and Morgan, D. (2013). Intracranial injection of AAV expressing NEP but not IDE reduces amyloid pathology in APP+PS1 transgenic mice. PloS One *8*, e59626.

Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdeux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. Am. J. Pathol. *165*, 1289–1300.

Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., and Yan, S.D. (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *19*, 2040–2041.

Chacón, M.A., Barría, M.I., Soto, C., and Inestrosa, N.C. (2004). Beta-sheet breaker peptide prevents Abeta-induced spatial memory impairments with partial reduction of amyloid deposits. Mol. Psychiatry *9*, 953–961.

Chambers, C.B., Sigurdsson, E.M., Hejna, M.J., Lorens, S.A., Lee, J.M., and Muma, N.A. (2000). Amyloid-beta injection in rat amygdala alters tau protein but not mRNA expression. Exp. Neurol. *162*, 158–170.

Chambon, C., Wegener, N., Gravius, A., and Danysz, W. (2011). Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-β peptides in rodents. Behav. Brain Res. *225*, 623–641.

Chan-Ling, T., Hughes, S., Baxter, L., Rosinova, E., McGregor, I., Morcos, Y., van Nieuwenhuyzen, P., and Hu, P. (2007). Inflammation and breakdown of the blood-retinal barrier during "physiological aging" in the rat retina: a model for CNS aging. Microcirc. N. Y. N 1994 *14*, 63–76.

Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. Nat. Neurosci. *2*, 271–276.

Chapman, R.M., McCrary, J.W., Gardner, M.N., Sandoval, T.C., Guillily, M.D., Reilly, L.A., and DeGrush, E. (2011). Brain ERP components predict which individuals progress to Alzheimer's disease and which do not. Neurobiol. Aging *32*, 1742–1755.

Charreau, B., Tesson, L., Soulillou, J.P., Pourcel, C., and Anegon, I. (1996). Transgenesis in rats: technical aspects and models. Transgenic Res. *5*, 223–234.

Chavant, F., Deguil, J., Pain, S., Ingrand, I., Milin, S., Fauconneau, B., Pérault-Pochat, M.-C., and Lafay-Chebassier, C. (2010). Imipramine, in part through tumor necrosis factor alpha inhibition, prevents cognitive decline and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. *332*, 505–514.

Chen, G., Chen, K.S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S.J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S.B., et al. (2000a). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature *408*, 975–979.

Chen, Q.S., Kagan, B.L., Hirakura, Y., and Xie, C.W. (2000b). Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. J. Neurosci. Res. *60*, 65–72.

Cheng, X.R., Zhou, W.X., Zhang, Y.X. (2014). The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. Ageing Res. Rev. *13*, 13-37.

Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. J. Biol. Chem. *276*, 21562–21570.

Cho, S.-H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T.M., Halabisky, B., Wes, P., Ransohoff, R.M., and Gan, L. (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. J. Biol. Chem. *286*, 32713–32722.

Christos, G.A. (1993). Is Alzheimer's disease related to a deficit or malfunction of rapid eye movement (REM) sleep? Med. Hypotheses *41*, 435–439.

Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D.T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 9535–9540.

Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. Nat. Neurosci. *8*, 79–84.

Clinton, L.K., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J.Q., and LaFerla, F.M. (2010). Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 7281–7289.

Codita, A., Winblad, B., and Mohammed, A.H. (2006). Of mice and men: more neurobiology in dementia. Curr. Opin. Psychiatry *19*, 555–563.

Cohen, N.J., and Squire, L.R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. Science *210*, 207–210.

Cohen, R.M., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T.M., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C.G., Breunig, J.J., et al. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric aβ, and frank neuronal loss. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 6245–6256.

Collingridge, G.L., Randall, A.D., Davies, C.H., and Alford, S. (1992). The synaptic activation of NMDA receptors and Ca2+ signalling in neurons. Ciba Found. Symp. *164*, 162–171; discussion 172–175.

Colrain, I.M., Turlington, S., and Baker, F.C. (2009). Impact of alcoholism on sleep architecture and EEG power spectra in men and women. Sleep *32*, 1341–1352.

Coltman, R., Spain, A., Tsenkina, Y., Fowler, J.H., Smith, J., Scullion, G., Allerhand, M., Scott, F., Kalaria, R.N., Ihara, M., et al. (2011). Selective white matter pathology induces a specific impairment in spatial working memory. Neurobiol. Aging *32*, 2324.e7–e12.

Correia, S.C., Santos, R.X., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P.I., and Smith, M.A. (2011). Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? Ageing Res. Rev. *10*, 264–273.

Correia, S.C., Resende, R., Moreira, P.I., and Pereira, C.M. (2015). Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu. DNA Cell Biol. *34*, 261–273.

Cotman, C.W., and Head, E. (2008). The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. J. Alzheimers Dis. JAD *15*, 685–707.

Cotman, C.W., Poon, W.W., Rissman, R.A., and Blurton-Jones, M. (2005). The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *64*, 104–112.

Craft, S. (2009). The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. Arch. Neurol. *66*, 300–305.

Craig-Schapiro, R., Kuhn, M., Xiong, C., Pickering, E.H., Liu, J., Misko, T.P., Perrin, R.J., Bales, K.R., Soares, H., Fagan, A.M., et al. (2011). Multiplexed immunoassay panel identifies novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis and prognosis. PloS One *6*, e18850.

Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Baker, L.K., Krafft, G.A., and LaDu, M.J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. J. Biol. Chem. *277*, 32046–32053.

Dargahi, L., Nasiraei-Moghadam, S., Abdi, A., Khalaj, L., Moradi, F., and Ahmadiani, A. (2011). Cyclooxygenase (COX)-1 activity precedes the COX-2 induction in Aβ-induced neuroinflammation. J. Mol. Neurosci. MN *45*, 10–21.

Darios, F., Muriel, M.-P., Khondiker, M.E., Brice, A., and Ruberg, M. (2005). Neurotoxic calcium transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria is regulated by cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of tau. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 4159–4168.

Dauvilliers, Y. (2007). Insomnia in patients with neurodegenerative conditions. Sleep Med. *8 Suppl 4*, S27–S34.

David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. J. Neurochem. *83*, 176–185.

Davis, C.J., Harding, J.W., and Wright, J.W. (2003). REM sleep deprivation-induced deficits in the latency-to-peak induction and maintenance of long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus. Brain Res. *973*, 293–297.

Davis, S., Butcher, S.P., and Morris, R.G. (1992). The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *12*, 21–34.

Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., et al. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. Neuroscience *90*, 1–13.

Dayton, R.D., Wang, D.B., and Klein, R.L. (2012a). The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. Expert Opin. Biol. Ther. *12*, 757–766.

Dayton, R.D., Wang, D.B., Cain, C.D., Schrott, L.M., Ramirez, J.J., King, M.A., and Klein, R.L. (2012b). Frontotemporal lobar degeneration-related proteins induce only subtle memory-related deficits when bilaterally overexpressed in the dorsal hippocampus. Exp. Neurol. *233*, 807–814.

Delacourte, A. (1990). General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. Neurology *40*, 33–37.

Delacourte, A. (2006). The natural and molecular history of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 187–194.

Delacourte, A., and Buée, L. (2005). [Animal models of Alzheimer's disease: a road full of pitfalls]. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil. *3*, 261–270.

Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghozali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. Neurology *52*, 1158–1165.

Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurage, C.-A., Lebert, F., Pasquier, F., and David, J.-P. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. Neurology *59*, 398–407.

Delobette, S., Privat, A., and Maurice, T. (1997). In vitro aggregation facilities beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. Eur. J. Pharmacol. *319*, 1–4.

Deuschle, M., Schilling, C., Leweke, F.M., Enning, F., Pollmächer, T., Esselmann, H., Wiltfang, J., Frölich, L., and Heuser, I. (2014). Hypocretin in cerebrospinal fluid is positively correlated with Tau and pTau. Neurosci. Lett. *561*, 41–45.

Deutsch, J.A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. Science *174*, 788–794.

Dewachter, I., Van Dorpe, J., Smeijers, L., Gilis, M., Kuipéri, C., Laenen, I., Caluwaerts, N., Moechars, D., Checler, F., Vanderstichele, H., et al. (2000). Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 6452–6458.

Diekelmann, S., and Born, J. (2010). The memory function of sleep. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 114–126.

Dillon, G.M., Qu, X., Marcus, J.N., and Dodart, J.-C. (2008). Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. Neurobiol. Learn. Mem. *90*, 426–433.

Dineley, K.T., Xia, X., Bui, D., Sweatt, J.D., and Zheng, H. (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. J. Biol. Chem. *277*, 22768–22780.

Doyle, E., Bruce, M.T., Breen, K.C., Smith, D.C., Anderton, B., and Regan, C.M. (1990). Intraventricular infusions of antibodies to amyloid-beta-protein precursor impair the acquisition of a passive avoidance response in the rat. Neurosci. Lett. *115*, 97–102.

Duara, R., Loewenstein, D.A., Potter, E., Appel, J., Greig, M.T., Urs, R., Shen, Q., Raj, A., Small, B., Barker, W., et al. (2008). Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. Neurology *71*, 1986–1992.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., et al. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. Nature *383*, 710–713.

Duffy, S., Labrie, V., and Roder, J.C. (2008). D-serine augments NMDA-NR2B receptor-dependent hippocampal long-term depression and spatial reversal learning. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *33*, 1004–1018.

Duyckaerts, C. (2004). Looking for the link between plaques and tangles. Neurobiol. Aging *25*, 735–739; discussion 743–746.

Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1997). Diagnosis and staging of Alzheimer disease. Neurobiol. Aging *18*, S33–S42.

Duyckaerts, C., Colle, M.A., Delatour, B., and Hauw, J.J. (1999). [Alzheimer's disease: lesions and their progression]. Rev. Neurol. (Paris) *155 Suppl 4*, S17–S27.

Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. Acta Neuropathol. (Berl.) *118*, 5–36.

Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Alhonen, L., Janne, J., Grant, S.M., Wandosell, F., Muro, A., Baralle, F., Li, H., Duff, K., et al. (2004a). Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex. J. Alzheimers Dis. JAD *6*, 209–219.

Echeverria, V., Ducatenzeiler, A., Dowd, E., Jänne, J., Grant, S.M., Szyf, M., Wandosell, F., Avila, J., Grimm, H., Dunnett, S.B., et al. (2004b). Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. Neuroscience *129*, 583–592.

Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., and De Gasperi, R. (2010). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Mt. Sinai J. Med. N. Y. *77*, 69–81.

Esiri, M.M., and Chance, S.A. (2006). Vulnerability to Alzheimer's pathology in neocortex: the roles of plasticity and columnar organization. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 79–89.

Fassbender, K., Walter, S., Kühl, S., Landmann, R., Ishii, K., Bertsch, T., Stalder, A.K., Muehlhauser, F., Liu, Y., Ulmer, A.J., et al. (2004). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *18*, 203–205.

Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., Novak, M., and Cattaneo, A. (2000). The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. J. Neurochem. *75*, 624–633.

De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. J. Biol. Chem. *282*, 11590–11601.

Forny-Germano, L., Lyra e Silva, N.M., Batista, A.F., Brito-Moreira, J., Gralle, M., Boehnke, S.E., Coe, B.C., Lablans, A., Marques, S.A., Martinez, A.M.B., et al. (2014). Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-β oligomers in nonhuman primates. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 13629–13643.

Fossati, S., Ghiso, J., and Rostagno, A. (2012). Insights into caspase-mediated apoptotic pathways induced by amyloid-β in cerebral microvascular endothelial cells. Neurodegener. Dis. *10*, 324–328.

Franco, R., and Cedazo-Minguez, A. (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? Front. Pharmacol. *5*, 146.

Frappier, T.F., Georgieff, I.S., Brown, K., and Shelanski, M.L. (1994). tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. J. Neurochem. *63*, 2288–2294.

Freir, D.B., Holscher, C., and Herron, C.E. (2001). Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. J. Neurophysiol. *85*, 708–713.

Frölich, L., Blum-Degen, D., Riederer, P., and Hoyer, S. (1999). A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. *893*, 290–293.

Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., et al. (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 10032–10037.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., and Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature *373*, 523–527.

Games, D., Buttini, M., Kobayashi, D., Schenk, D., and Seubert, P. (2006). Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 133–149.

Gandy, S., DeMattos, R.B., Lemere, C.A., Heppner, F.L., Leverone, J., Aguzzi, A., Ershler, W.B., Dai, J., Fraser, P., St George Hyslop, P., et al. (2004). Alzheimer's Abeta vaccination of rhesus monkeys (Macaca mulatta). Mech. Ageing Dev. *125*, 149–151.

Gao, Y., and Pimplikar, S.W. (2001). The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 14979–14984.

Garcia-Osta, A., and Alberini, C.M. (2009). Amyloid beta mediates memory formation. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *16*, 267–272.

García-Sierra, F., Ghoshal, N., Quinn, B., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2003). Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *5*, 65–77.

Gelfo, F., Tirassa, P., De Bartolo, P., Caltagirone, C., Petrosini, L., and Angelucci, F. (2011). Brain and serum levels of nerve growth factor in a rat model of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *25*, 213–217.

Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E., et al. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. Nature *428*, 493–521.

Giedraitis, V., Sundelöf, J., Irizarry, M.C., Gårevik, N., Hyman, B.T., Wahlund, L.-O., Ingelsson, M., and Lannfelt, L. (2007). The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. *427*, 127–131.

Giovannini, M.G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Vannucchi, M.G., Rosi, S., Pepeu, G., and Casamenti, F. (2002). Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. Neurobiol. Dis. *11*, 257–274.

Glenner, G.G. (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). N. Engl. J. Med. *302*, 1283–1292.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. *120*, 885–890.

Goedert, M., Klug, A., and Crowther, R.A. (2006). Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 195–207.

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. *41*, 17–24.

Gonatas, N.K., Stieber, A., and Gonatas, J.O. (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. J. Neurol. Sci. *246*, 21–30.

Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001a). Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. Science *293*, 1491–1495.

Götz, J., Chen, F., Barmettler, R., and Nitsch, R.M. (2001b). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. J. Biol. Chem. *276*, 529–534.

Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., et al. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. Am. J. Pathol. *156*, 15–20.

Granic, I., Masman, M.F., Kees Mulder, C., Nijholt, I.M., Naude, P.J.W., de Haan, A., Borbély, E., Penke, B., Luiten, P.G.M., and Eisel, U.L.M. (2010). LPYFDa neutralizes amyloid-beta-induced memory impairment and toxicity. J. Alzheimers Dis. JAD *19*, 991–1005.

Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Hundsdörfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., et al. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic β- and γ-secretase cleavage regulates neprilysin expression. Front. Aging Neurosci. *7*, 77.

Hajós, M., Morozova, E., Siok, C., Atchison, K., Nolan, C.E., Riddell, D., Kiss, T., and Hajós-Korcsok, E. (2013). Effects of the γ-secretase inhibitor semagacestat on hippocampal neuronal network oscillation. Front. Pharmacol. *4*, 72.

Hanes, J., Zilka, N., Bartkova, M., Caletkova, M., Dobrota, D., and Novak, M. (2009). Rat tau proteome consists of six tau isoforms: implication for animal models of human tauopathies. J. Neurochem. *108*, 1167–1176.

Hardy, J., and Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol. Sci. *12*, 383–388.

Harkany, T., Abrahám, I., Timmerman, W., Laskay, G., Tóth, B., Sasvári, M., Kónya, C., Sebens, J.B., Korf, J., Nyakas, C., et al. (2000). beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. Eur. J. Neurosci. *12*, 2735–2745.

Hassainia, F., Petit, D., Nielsen, T., Gauthier, S., and Montplaisir, J. (1997). Quantitative EEG and statistical mapping of wakefulness and REM sleep in the evaluation of mild to moderate Alzheimer's disease. Eur. Neurol. *37*, 219–224.

Heggland, I., Storkaas, I.S., Soligard, H.T., Kobro-Flatmoen, A., and Witter, M.P. (2015). Stereological estimation of neuron number and plaque load in the hippocampal region of a transgenic rat model of Alzheimer's disease. Eur. J. Neurosci. *41*, 1245–1262.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., and Rusakov, D.A. (2010). Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. Nature *463*, 232–236.

Hernandez, R.V., Navarro, M.M., Rodriguez, W.A., Martinez, J.L., and LeBaron, R.G. (2005). Differences in the magnitude of long-term potentiation produced by theta burst and high frequency stimulation protocols matched in stimulus number. Brain Res. Brain Res. Protoc. *15*, 6–13.

Herzig, M.C., Winkler, D.T., Burgermeister, P., Pfeifer, M., Kohler, E., Schmidt, S.D., Danner, S., Abramowski, D., Stürchler-Pierrat, C., Bürki, K., et al. (2004). Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. Nat. Neurosci. *7*, 954–960.

Hickman, S.E., Allison, E.K., and Khoury, J. El (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 8354–8360.

van der Hiele, K., Vein, A.A., Reijntjes, R.H. a. M., Westendorp, R.G.J., Bollen, E.L.E.M., van Buchem, M.A., van Dijk, J.G., and Middelkoop, H. a. M. (2007). EEG correlates in the spectrum of cognitive decline. Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol. *118*, 1931–1939.

van der Hiele, K., Reijntjes, R.H.A.M., Vein, A.A., Westendorp, R.G.J., van Buchem, M.A., Bollen, E.L.E.M., Middelkoop, H.A.M., and van Dijk, J.G. (2011). Electromyographic activity in the EEG in Alzheimer's disease: noise or signal? Int. J. Alzheimers Dis. *2011*, 547024.

Hodges, J. (1998). The amnestic prodrome of Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *121 (Pt 9)*, 1601–1602.

Hodges, D.B., Lindner, M.D., Hogan, J.B., Jones, K.M., and Markus, E.J. (2009). Scopolamine induced deficits in a battery of rat cognitive tests: comparisons of sensitivity and specificity. Behav. Pharmacol. *20*, 237–251.

Holcomb, L., Gordon, M.N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. Nat. Med. *4*, 97–100.

Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R.W., Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., et al. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. Lancet Lond. Engl. *372*, 216–223.

Hori, T., Sugita, Y., Koga, E., Shirakawa, S., Inoue, K., Uchida, S., Kuwahara, H., Kousaka, M., Kobayashi, T., Tsuji, Y., et al. (2001). Proposed supplements and amendments to "A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects", the Rechtschaffen & Kales (1968) standard. Psychiatry Clin. Neurosci. *55*, 305–310.

Hornick, A., Lieb, A., Vo, N.P., Rollinger, J.M., Stuppner, H., and Prast, H. (2011). The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. Neuroscience *197*, 280–292.

Hot, P., Rauchs, G., Bertran, F., Denise, P., Desgranges, B., Clochon, P., and Eustache, F. (2011). Changes in sleep theta rhythm are related to episodic memory impairment in early Alzheimer's disease. Biol. Psychol. *87*, 334–339.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science *274*, 99–102.

Hu, N.-W., Smith, I.M., Walsh, D.M., and Rowan, M.J. (2008). Soluble amyloid-beta peptides potently disrupt hippocampal synaptic plasticity in the absence of cerebrovascular dysfunction in vivo. Brain J. Neurol. *131*, 2414–2424.

Hwang, D.Y., Chae, K.R., Kang, T.S., Hwang, J.H., Lim, C.H., Kang, H.K., Goo, J.S., Lee, M.R., Lim, H.J., Min, S.H., et al. (2002). Alterations in behavior, amyloid beta-42, caspase-3, and Cox-2 in mutant PS2 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *16*, 805–813.

Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2006). Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 219–242.

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M.K., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. Neuron *24*, 751–762.

Itoh, A., Akaike, T., Sokabe, M., Nitta, A., Iida, R., Olariu, A., Yamada, K., and Nabeshima, T. (1999). Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of beta-amyloid-infused rats. Eur. J. Pharmacol. *382*, 167–175.

Jack, C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Weiner, M.W., Aisen, P.S., Shaw, L.M., Vemuri, P., Wiste, H.J., Weigand, S.D., et al. (2013). Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. Lancet Neurol. *12*, 207–216.

Jacob, H.J., and Kwitek, A.E. (2002). Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. Nat. Rev. Genet. *3*, 33–42.

Jantaratnotai, N., Ryu, J.K., Kim, S.U., and McLarnon, J.G. (2003). Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation in vivo. Neuroreport *14*, 1429–1433.

Jasper, H.H., and Tessier, J. (1971). Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. Science *172*, 601–602.

Jaworski, T., Dewachter, I., Seymour, C.M., Borghgraef, P., Devijver, H., Kügler, S., and Van Leuven, F. (2010). Alzheimer's disease: old problem, new views from transgenic and viral models. Biochim. Biophys. Acta *1802*, 808–818.

Jaworski, T., Lechat, B., Demedts, D., Gielis, L., Devijver, H., Borghgraef, P., Duimel, H., Verheyen, F., Kügler, S., and Van Leuven, F. (2011). Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration. Am. J. Pathol. *179*, 2001–2015.

Jedlicka, P., Owen, M., Vnencak, M., Tschäpe, J.-A., Hick, M., Müller, U.C., and Deller, T. (2012). Functional consequences of the lack of amyloid precursor protein in the mouse dentate gyrus in vivo. Exp. Brain Res. *217*, 441–447.

Josephs, K.A., Whitwell, J.L., Knopman, D.S., Hu, W.T., Stroh, D.A., Baker, M., Rademakers, R., Boeve, B.F., Parisi, J.E., Smith, G.E., et al. (2008). Abnormal TDP-43 immunoreactivity in AD modifies clinicopathologic and radiologic phenotype. Neurology *70*, 1850–1857.

Jyoti, A., Plano, A., Riedel, G., and Platt, B. (2010). EEG, activity, and sleep architecture in a transgenic AβPPswe/PSEN1A246E Alzheimer's disease mouse. J. Alzheimers Dis. JAD *22*, 873–887.

Kallop, D.Y., Meilandt, W.J., Gogineni, A., Easley-Neal, C., Wu, T., Jubb, A.M., Yaylaoglu, M., Shamloo, M., Tessier-Lavigne, M., Scearce-Levie, K., et al. (2014). A death receptor 6-amyloid precursor protein pathway regulates synapse density in the mature CNS but does not contribute to Alzheimer's disease-related pathophysiology in murine models. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 6425–6437.

Kang, N., Peng, H., Yu, Y., Stanton, P.K., Guilarte, T.R., and Kang, J. (2013). Astrocytes release D-serine by a large vesicle. Neuroscience *240*, 243–257.

Kapai, N.A., Bukanova, J.V., Solntseva, E.I., and Skrebitsky, V.G. (2012). Donepezil in a narrow concentration range augments control and impaired by beta-amyloid peptide hippocampal LTP in NMDAR-independent manner. Cell. Mol. Neurobiol. *32*, 219–226.

Kawai, H., Zago, W., and Berg, D.K. (2002). Nicotinic alpha 7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 7903–7912.

Kay, C., Harper, D.N., and Hunt, M. (2010). Differential effects of MDMA and scopolamine on working versus reference memory in the radial arm maze task. Neurobiol. Learn. Mem. *93*, 151–156.

Khandelwal, P.J., Dumanis, S.B., Herman, A.M., Rebeck, G.W., and Moussa, C.E.-H. (2012). Wild type and P301L mutant Tau promote neuro-inflammation and α-Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models. Mol. Cell. Neurosci. *49*, 44–53.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature *197*, 192–193.

Kidd, M. (2006). The history of the paired helical filaments. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 71–75.

Kim, J.H., Anwyl, R., Suh, Y.H., Djamgoz, M.B., and Rowan, M.J. (2001). Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of (beta)-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 1327–1333.

Kiyota, T., Ingraham, K.L., Jacobsen, M.T., Xiong, H., and Ikezu, T. (2011). FGF2 gene transfer restores hippocampal functions in mouse models of Alzheimer's disease and has therapeutic implications for neurocognitive disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, E1339–E1348.

Klein, R.L., Lin, W.-L., Dickson, D.W., Lewis, J., Hutton, M., Duff, K., Meyer, E.M., and King, M.A. (2004). Rapid neurofibrillary tangle formation after localized gene transfer of mutated tau. Am. J. Pathol. *164*, 347–353.

Knobloch, M., Farinelli, M., Konietzko, U., Nitsch, R.M., and Mansuy, I.M. (2007a). Abeta oligomer-mediated long-term potentiation impairment involves protein phosphatase 1-dependent mechanisms. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 7648–7653.

Knobloch, M., Konietzko, U., Krebs, D.C., and Nitsch, R.M. (2007b). Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice. Neurobiol. Aging *28*, 1297–1306.

Koffie, R.M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K.W., Mielke, M.L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K.D., Smith, S.J., Kim, M.L., Lee, V.M., et al. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 4012–4017.

Koffie, R.M., Hyman, B.T., and Spires-Jones, T.L. (2011). Alzheimer's disease: synapses gone cold. Mol. Neurodegener. *6*, 63.

Konsoula, Z., and Barile, F.A. (2012). Epigenetic histone acetylation and deacetylation mechanisms in experimental models of neurodegenerative disorders. J. Pharmacol. Toxicol. Methods *66*, 215–220.

Korhonen, P., van Groen, T., Thornell, A., Kyrylenko, S., Soininen, M.-L., Ojala, J., Peltomaa, E., Tanila, H., Salminen, A., Mandelkow, E.M., et al. (2011). Characterization of a novel transgenic rat carrying human tau with mutation P301L. Neurobiol. Aging *32*, 2314–2315.

Korte, M., Herrmann, U., Zhang, X., and Draguhn, A. (2012). The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. Exp. Brain Res. *217*, 435–440.

Kotzbauer, P.T., Giasson, B.I., Kravitz, A.V., Golbe, L.I., Mark, M.H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Fibrillization of alpha-synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T alpha-synuclein mutation. Exp. Neurol. *187*, 279–288.

Kovacs, G.G., Milenkovic, I., Wöhrer, A., Höftberger, R., Gelpi, E., Haberler, C., Hönigschnabl, S., Reiner-Concin, A., Heinzl, H., Jungwirth, S., et al. (2013). Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. Acta Neuropathol. (Berl.) *126*, 365–384.

Kremer, A., Louis, J.V., Jaworski, T., and Van Leuven, F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction…. Front. Mol. Neurosci. *4*, 17.

Krogsgaard-Larsen, P., and Hansen, J.J. (1992). Naturally-occurring excitatory amino acids as neurotoxins and leads in drug design. Toxicol. Lett. *64-65 Spec No*, 409–416.

Kumar, V.B., Farr, S.A., Flood, J.F., Kamlesh, V., Franko, M., Banks, W.A., Morley, J.E. (2000). Site directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. Peptides *21*, 1769-1775.

Kumar-Singh, S. (2008). Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. Genes Brain Behav. *7 Suppl 1*, 67–82.

Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 796–807.

Lai, M.K.P., Tsang, S.W.Y., Garcia-Alloza, M., Minger, S.L., Nicoll, J.A.R., Esiri, M.M., Wong, P.T.-H., Chen, C.P.L.-H., Ramírez, M.J., and Francis, P.T. (2006). Selective effects of the APOE epsilon4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease. Neurobiol. Dis. *22*, 555–561.

Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 6448–6453.

Landreth, G.E., and Reed-Geaghan, E.G. (2009). Toll-like receptors in Alzheimer's disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *336*, 137–153.

Larson, M.E., Sherman, M.A., Greimel, S., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., and Lesné, S.E. (2012). Soluble α-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 10253–10266.

Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G.R., and Kayed, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. Sci. Rep. *2*, 700.

Lawlor, P.A., Bland, R.J., Das, P., Price, R.W., Holloway, V., Smithson, L., Dicker, B.L., During, M.J., Young, D., and Golde, T.E. (2007). Novel rat Alzheimer's disease models based on AAV-mediated gene transfer to selectively increase hippocampal Abeta levels. Mol. Neurodegener. *2*, 11.

Lega, B.C., Jacobs, J., and Kahana, M. (2012). Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. Hippocampus *22*, 748–761.

Leiser, S.C., Dunlop, J., Bowlby, M.R., and Devilbiss, D.M. (2011). Aligning strategies for using EEG as a surrogate biomarker: a review of preclinical and clinical research. Biochem. Pharmacol. *81*, 1408–1421.

Leissring, M.A., Murphy, M.P., Mead, T.R., Akbari, Y., Sugarman, M.C., Jannatipour, M., Anliker, B., Müller, U., Saftig, P., De Strooper, B., et al. (2002). A physiologic signaling role for the gamma - secretase-derived intracellular fragment of APP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 4697–4702.

Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kayed, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature *440*, 352–357.

Levenson, J., Weeber, E., Selcher, J.C., Kategaya, L.S., Sweatt, J.D., and Eskin, A. (2002). Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. Nat. Neurosci. *5*, 155–161.

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., et al. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. Nat. Genet. *25*, 402–405.

Li, G., Cheng, H., Zhang, X., Shang, X., Xie, H., Zhang, X., Yu, J., Han, J.(2013). Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice. Neurol. Sci. 34, 963-969.

Li, M., Chen, L., Lee, D.H.S., Yu, L.-C., and Zhang, Y. (2007). The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. *83*, 131–139.

Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. Neuron *62*, 788–801.

Lin, J.H. (1995). Species similarities and differences in pharmacokinetics. Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. *23*, 1008–1021.

Liu, M.Y., Wang, S., Yao, W.F., Zhang, Z.J., Zhong, X., Sha, L., He, M., Zheng, Z.H., and Wei, M.J. (2014). Memantine improves spatial learning and memory impairments by regulating NGF signaling in APP/PS1 transgenic mice. Neuroscience *273*, 141–151.

Lloret, A., Badía, M.-C., Mora, N.J., Ortega, A., Pallardó, F.V., Alonso, M.-D., Atamna, H., and Viña, J. (2008). Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. *44*, 2019–2025.

Lonskaya, I., Hebron, M., Chen, W., Schachter, J., and Moussa, C. (2014). Tau deletion impairs intracellular β-amyloid-42 clearance and leads to more extracellular plaque deposition in gene transfer models. Mol. Neurodegener. *9*, 46.

Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J., and Cotman, C.W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 7951–7955.

Lopez, E.M., Bell, K.F.S., Ribeiro-da-Silva, A., and Cuello, A.C. (2004). Early changes in neurons of the hippocampus and neocortex in transgenic rats expressing intracellular human a-beta. J. Alzheimers Dis. JAD *6*, 421–431; discussion 443–449.

Luckhaus, C., Grass-Kapanke, B., Blaeser, I., Ihl, R., Supprian, T., Winterer, G., Zielasek, J., and Brinkmeyer, J. (2008). Quantitative EEG in progressing vs stable mild cognitive impairment (MCI): results of a 1-year follow-up study. Int. J. Geriatr. Psychiatry *23*, 1148–1155.

Lue, L.F., Walker, D.G., and Rogers, J. (2001). Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. Neurobiol. Aging *22*, 945–956.

Ma, H., Lesné, S., Kotilinek, L., Steidl-Nichols, J.V., Sherman, M., Younkin, L., Younkin, S., Forster, C., Sergeant, N., Delacourte, A., et al. (2007). Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 8167–8172.

Magistretti, P.J. (2011). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. Exp. Physiol. *96*, 407–410.

Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. EMBO J. *26*, 4546–4554.

Malek, M., Zahedi Asl, S., Sarkaki, A., Farbood, Y., and Doulah, A.H. (2009). The effect of intra-hippocampal injection of growth hormone on spatial learning and memory in animal model of Alzheimer's disease. Pak. J. Biol. Sci. PJBS *12*, 1237–1245.

Malin, D.H., Crothers, M.K., Lake, J.R., Goyarzu, P., Plotner, R.E., Garcia, S.A., Spell, S.H., Tomsic, B.J., Giordano, T., and Kowall, N.W. (2001). Hippocampal injections of amyloid beta-peptide 1-40 impair subsequent one-trial/day reward learning. Neurobiol. Learn. Mem. *76*, 125–137.

Malkki, H.A., Donga, L.A., de Groot, S.E., Battaglia, F.P.; NeuroBSIK Mouse Phenomics Consortium, Pennartz, C.M. (2010). Appetitive operant conditioning in mice: heritability and dissociability of training stages. Front. Behav. Neurosci. *4*, 171.

Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. Trends Cell Biol. *8*, 425–427.

Manns, J.R., Zilli, E.A., Ong, K.C., Hasselmo, M.E., and Eichenbaum, H. (2007). Hippocampal CA1 spiking during encoding and retrieval: relation to theta phase. Neurobiol. Learn. Mem. *87*, 9–20.

Marr, R.A., Guan, H., Rockenstein, E., Kindy, M., Gage, F.H., Verma, I., Masliah, E., and Hersh, L.B. (2004). Neprilysin regulates amyloid Beta peptide levels. J. Mol. Neurosci. MN *22*, 5–11.

Martin, S.B., Dowling, A.L.S., and Head, E. (2011). Therapeutic interventions targeting Beta amyloid pathogenesis in an aging dog model. Curr. Neuropharmacol. *9*, 651–661.

Masliah, E., Sisk, A., Mallory, M., Mucke, L., Schenk, D., and Games, D. (1996). Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 5795–5811.

Masliah, E., Sisk, A., Mallory, M., and Games, D. (2001). Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *60*, 357–368.

Masuoka, T., and Kamei, C. (2007). Role of hippocampal H1 receptors in radial maze performance and hippocampal theta activity in rats. Brain Res. Bull. *73*, 231–237.

Masuoka, T., and Kamei, C. (2009). The ameliorating effects of NMDA receptor agonists on histamine H1 antagonist-induced memory and hippocampal theta disruptions are prevented by the H3 receptor agonist in rats. Brain Res. Bull. *79*, 422–425.

Maurice, T., Lockhart, B.P., and Privat, A. (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain Res. *706*, 181–193.

McCown, T.J. (2011). Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. Curr. Gene Ther. *11*, 181–188.

McCurry, S.M., Logsdon, R.G., Teri, L., Gibbons, L.E., Kukull, W.A., Bowen, J.D., McCormick, W.C., and Larson, E.B. (1999). Characteristics of sleep disturbance in community-dwelling Alzheimer's disease patients. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. *12*, 53–59.

McCurry, S.M., Reynolds, C.F., Ancoli-Israel, S., Teri, L., and Vitiello, M.V. (2000). Treatment of sleep disturbance in Alzheimer's disease. Sleep Med. Rev. *4*, 603–628.

McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G., and Magee, J.C. (2003). Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 9687–9695.

McGeer, P.L., Rogers, J., and McGeer, E.G. (2006). Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. J. Alzheimers Dis. JAD *9*, 271–276.

Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. Lancet Lond. Engl. *349*, 1546–1549.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., et al. (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. Neuron *47*, 191–199.

McKee, A.C., Kosik, K.S., and Kowall, N.W. (1991). Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. *30*, 156–165.

Meunier, J., Villard, V., Givalois, L., and Maurice, T. (2013). The γ-secretase inhibitor 2-[(1R)-1-[(4-chlorophenyl)sulfonyl](2,5-difluorophenyl) amino]ethyl-5-fluorobenzenebutanoic acid (BMS-299897) alleviates Aβ1-42 seeding and short-term memory deficits in the Aβ25-35 mouse model of Alzheimer's disease. Eur. J. Pharmacol. *698*, 193–199.

Middei, S., Houeland, G., Cavallucci, V., Ammassari-Teule, M., Amelio, M. D', and Marie, H. (2013). CREB is necessary for synaptic maintenance and learning-induced changes of the AMPA receptor GluA1 subunit. Hippocampus *23*, 488–499.

Mileusnic, R., Lancashire, C.L., and Rose, S.P.R. (2005). Amyloid precursor protein: from synaptic plasticity to Alzheimer's disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1048*, 149–165.

Min, S.S., An, J., Lee, J.-H., Seol, G.H., Im, J.H., Kim, H.-S., Baik, T.-K., and Woo, R.-S. (2011). Neuregulin-1 prevents amyloid β-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal slices via ErbB4. Neurosci. Lett. *505*, 6–9.

Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., and Berg, L. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. Neurology *41*, 479–486.

Moraes, W. dos S., Poyares, D.R., Guilleminault, C., Ramos, L.R., Bertolucci, P.H.F., and Tufik, S. (2006). The effect of donepezil on sleep and REM sleep EEG in patients with Alzheimer disease: a double-blind placebo-controlled study. Sleep *29*, 199–205.

Moran, M., Lynch, C.A., Walsh, C., Coen, R., Coakley, D., and Lawlor, B.A. (2005). Sleep disturbance in mild to moderate Alzheimer's disease. Sleep Med. *6*, 347–352.

Morgan, D., Munireddy, S., Alamed, J., DeLeon, J., Diamond, D.M., Bickford, P., Hutton, M., Lewis, J., McGowan, E., Gordon, M.N. (2008). Apparent behavioral benefits of tau overexpression in P301L tau transgenic mice. J. Alzheimers Dis. *15*, 605-614.

Morgan, D. (2009). Water Maze Tasks in Mice: Special Reference to Alzheimer's Transgenic Mice. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, J.J. Buccafusco, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press),.

Morris, J.C. (2005). Early-stage and preclinical Alzheimer disease. Alzheimer Dis. Assoc. Disord. *19*, 163–165.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods *11*, 47–60.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature *319*, 774–776.

Mouri, A., Zou, L.-B., Iwata, N., Saido, T.C., Wang, D., Wang, M.-W., Noda, Y., and Nabeshima, T. (2006). Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory. Behav. Brain Res. *168*, 83–91.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Perez, A., Holloway, L.P., Barbaro, R.P., Barbaro, J.R., Wilson, L.M., Threadgill, D.W., Lauder, J.M., Magnuson, T.R., Crawley, J.N. (2007). Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. Behav. Brain Res. *176*, 4–20.

Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2004). Trisomy 21 and the brain. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *63*, 679–685.

Mura, E., Zappettini, S., Preda, S., Biundo, F., Lanni, C., Grilli, M., Cavallero, A., Olivero, G., Salamone, A., Govoni, S., et al. (2012). Dual effect of beta-amyloid on α7 and α4β2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. PloS One *7*, e29661.

Murray, A.J., Sauer, J.-F., Riedel, G., McClure, C., Ansel, L., Cheyne, L., Bartos, M., Wisden, W., and Wulff, P. (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. Nat. Neurosci. *14*, 297–299.

Nagele, R.G., Andrea, M.R. D', Anderson, W.J., and Wang, H.-Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. Neuroscience *110*, 199–211.

Nagy, Z., Esiri, M.M., Jobst, K.A., Morris, J.H., King, E.M., McDonald, B., Litchfield, S., Smith, A., Barnetson, L., and Smith, A.D. (1995). Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. Dement. Basel Switz. *6*, 21–31.

Nakagawa, Y., Yuzuriha, T., and Iwaki, T. (2004). Active clearance of human amyloid beta 1-42 peptide aggregates from the rat ventricular system. Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol. *24*, 194–200.

Nakamura, S., Murayama, N., Noshita, T., Annoura, H., and Ohno, T. (2001). Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. Brain Res. *912*, 128–136.

Newman, L.A., Korol, D.L., and Gold, P.E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. PloS One *6*, e28427.

Niewoehner, B., Single, F.N., Hvalby, Ø., Jensen, V., Meyer zum Alten Borgloh, S., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N.P., Sprengel, R., and Bannerman, D.M. (2007). Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. Eur. J. Neurosci. *25*, 837–846.

Nitta, A., Itoh, A., Hasegawa, T., and Nabeshima, T. (1994). beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. Neurosci. Lett. *170*, 63–66.

Nomura, I., Takechi, H., and Kato, N. (2012). Intraneuronally injected amyloid β inhibits long-term potentiation in rat hippocampal slices. J. Neurophysiol. *107*, 2526–2531.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 10129–10140.

Oberstein, T.J., Spitzer, P., Klafki, H.-W., Linning, P., Neff, F., Knölker, H.-J., Lewczuk, P., Wiltfang, J., Kornhuber, J., and Maler, J.M. (2015). Astrocytes and microglia but not neurons preferentially generate N-terminally truncated Aβ peptides. Neurobiol. Dis. *73*, 24–35.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron *39*, 409–421.

Odero, G.L., Oikawa, K., Glazner, K. a. C., Schapansky, J., Grossman, D., Thiessen, J.D., Motnenko, A., Ge, N., Martin, M., Glazner, G.W., et al. (2010). Evidence for the involvement of calbindin D28k in the presenilin 1 model of Alzheimer's disease. Neuroscience *169*, 532–543.

Ogino, R., Murayama, N., Noshita, T., Takemoto, N., Toba, T., Oka, T., Narii, N., Yoshida, S., Ueno, N., and Inoue, T. (2014). SUN11602 has basic fibroblast growth factor-like activity and attenuates neuronal damage and cognitive deficits in a rat model of Alzheimer's disease induced by amyloid β and excitatory amino acids. Brain Res. *1585*, 159–166.

O'Hare, E., Scopes, D.I.C., Kim, E.-M., Palmer, P., Spanswick, D., McMahon, B., Amijee, H., Nerou, E., Treherne, J.M., and Jeggo, R. (2014). Novel 5-aryloxypyrimidine SEN1576 as a candidate for the treatment of Alzheimer's disease. Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP *17*, 117–126.

Ondrejcak, T., Wang, Q., Kew, J.N.C., Virley, D.J., Upton, N., Anwyl, R., and Rowan, M.J. (2012). Activation of α7 nicotinic acetylcholine receptors persistently enhances hippocampal synaptic transmission and prevents Aß-mediated inhibition of LTP in the rat hippocampus. Eur. J. Pharmacol. *677*, 63–70.

Onyike, C.U., Sheppard, J.-M.E., Tschanz, J.T., Norton, M.C., Green, R.C., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K.A., Breitner, J.C., and Lyketsos, C.G. (2007). Epidemiology of apathy in older adults: the Cache County Study. Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry *15*, 365–375.

Osinde, M., Clavaguera, F., May-Nass, R., Tolnay, M., and Dev, K.K. (2008). Lentivirus Tau (P301S) expression in adult amyloid precursor protein (APP)-transgenic mice leads to tangle formation. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *34*, 523–531.

Pallas, M., Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). J. Alzheimers Dis. *15*, 615-624.

Palop, J.J., Chin, J., Roberson, E.D., Wang, J., Thwin, M.T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K.O., Yu, G.-Q., Kreitzer, A., et al. (2007). Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. Neuron *55*, 697–711.

Pang, K.C., Miller, J.P., Fortress, A., McAuley, J.D. (2006). Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAMP8). Age (Dordr.) *28*, 283-296.

Pansari, K., Gupta, A., and Thomas, P. (2002). Alzheimer's disease and vascular factors: facts and theories. Int. J. Clin. Pract. *56*, 197–203.

Paris, D., Townsend, K., Quadros, A., Humphrey, J., Sun, J., Brem, S., Wotoczek-Obadia, M., DelleDonne, A., Patel, N., Obregon, D.F., et al. (2004). Inhibition of angiogenesis by Abeta peptides. Angiogenesis *7*, 75–85.

Park, M.H., Lee, J.K., Choi, S., Ahn, J., Jin, H.K., Park, J.-S., and Bae, J. (2013). Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice. Brain Res. *1529*, 113–124.

Patten, A.R., Fontaine, C.J., Christie B.R. (2014). A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. Front. Pediatr. *2*, 93.

Pazzagli, A., and Pepeu, G. (1965). Amnesic properties of scopolamine and brain acetylcholine in the rat. Int. J. Neuropharmacol. *4*, 291–299.

Pearson, B.E., and Choi, T.K. (1993). Expression of the human beta-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 10578–10582.

Peña-Ortega, F., and Bernal-Pedraza, R. (2012). Amyloid Beta Peptide slows down sensory-induced hippocampal oscillations. Int. J. Pept. *2012*, 236289.

Perouansky, M., Rau, V., Ford, T., Oh, S.I., Perkins, M., Eger, E.I., and Pearce, R.A. (2010). Slowing of the hippocampal θ rhythm correlates with anesthetic-induced amnesia. Anesthesiology *113*, 1299–1309.

Petersen, R.C. (2003). Mild cognitive impairment clinical trials. Nat. Rev. Drug Discov. *2*, 646–653.

Petit, D., Montplaisir, J., Lorrain, D., and Gauthier, S. (1993). THA does not affect sleep or EEG spectral power in Alzheimer's disease. Biol. Psychiatry *33*, 753–754.

Pietropaolo, S., Delage, P., Lebreton, F., Crusio, W.E., and Cho, Y.H. (2012). Early development of social deficits in APP and APP-PS1 mice. Neurobiol. Aging *33*, 1002.e17–e27.

Pita-Almenar, J.D., Collado, M.S., Colbert, C.M., and Eskin, A. (2006). Different mechanisms exist for the plasticity of glutamate reuptake during early long-term potentiation (LTP) and late LTP. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 10461–10471.

Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., and Pearson, H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 5531–5535.

Platt, B., Drever, B., Koss, D., Stoppelkamp, S., Jyoti, A., Plano, A., Utan, A., Merrick, G., Ryan, D., Melis, V., et al. (2011). Abnormal cognition, sleep, EEG and brain metabolism in a novel knock-in Alzheimer mouse, PLB1. PloS One *6*, e27068.

Popović, N., Baño-Otálora, B., Rol, M.A., Caballero-Bleda, M., Madrid, J.A., and Popović, M. (2009). Aging and time-of-day effects on anxiety in female Octodon degus. Behav. Brain Res. *200*, 117–121.

Portero-Tresserra, M., Del Olmo, N., Martí-Nicolovius, M., Guillazo-Blanch, G., and Vale-Martínez, A. (2014). D-cycloserine prevents relational memory deficits and suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in the hippocampus. Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol. *24*, 1798–1807.

Post, A.M., Wultsch, T., Popp, S., Painsipp, E., Wetzstein, H., Kittel-Schneider, S., Sontag, T.A., Lesch, K.-P., and Reif, A. (2011). The COGITAT holeboard system as a valuable tool to assess learning, memory and activity in mice. Behav. Brain Res. *220*, 152–158.

Postina, R. (2008). A closer look at alpha-secretase. Curr. Alzheimer Res. *5*, 179–186.

Prichep, L.S. (2007). Quantitative EEG and electromagnetic brain imaging in aging and in the evolution of dementia. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1097*, 156–167.

Prinz, P.N., Larsen, L.H., Moe, K.E., and Vitiello, M.V. (1992). EEG markers of early Alzheimer's disease in computer selected tonic REM sleep. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. *83*, 36–43.

Puzzo, D., and Arancio, O. (2013). Amyloid-β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? J. Alzheimers Dis. JAD *33 Suppl 1*, S111–S120.

Puzzo, D., Privitera, L., Fa', M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E.M., Troy, C.M., Mercken, M., et al. (2011). Endogenous amyloid-β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. Ann. Neurol. *69*, 819–830.

Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., and Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. Expert Opin. Drug Discov. *10*, 703–711.

Quon, D., Wang, Y., Catalano, R., Scardina, J.M., Murakami, K., and Cordell, B. (1991). Formation of beta-amyloid protein deposits in brains of transgenic mice. Nature *352*, 239–241.

Rajapaksha, T.W., Eimer, W.A., Bozza, T.C., and Vassar, R. (2011). The Alzheimer's β-secretase enzyme BACE1 is required for accurate axon guidance of olfactory sensory neurons and normal glomerulus formation in the olfactory bulb. Mol. Neurodegener. *6*, 88.

Ramirez, J.J., Poulton, W.E., Knelson, E., Barton, C., King, M.A., and Klein, R.L. (2011). Focal expression of mutated tau in entorhinal cortex neurons of rats impairs spatial working memory. Behav. Brain Res. *216*, 332–340.

Ramsden, M., Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., Guimaraes, A., Yue, M., Lewis, J., Carlson, G., et al. (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 10637–10647.

Rauchs, G., Orban, P., Schmidt, C., Albouy, G., Balteau, E., Degueldre, C., Schnackers, C., Sterpenich, V., Tinguely, G., Luxen, A., et al. (2008). Sleep modulates the neural substrates of both spatial and contextual memory consolidation. PloS One *3*, e2949.

Rauchs, G., Harand, C., Bertran, F., Desgranges, B., and Eustache, F. (2010). [Sleep and episodic memory: a review of the literature in young healthy subjects and potential links between sleep changes and memory impairment observed during aging and Alzheimer's disease]. Rev. Neurol. (Paris) *166*, 873–881.

Raz, N., Ghisletta, P., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., and Lindenberger, U. (2010). Trajectories of brain aging in middle-aged and older adults: regional and individual differences. NeuroImage *51*, 501–511.

Rebeck, G.W., Hoe, H.-S., and Moussa, C.E.-H. (2010). Beta-amyloid1-42 gene transfer model exhibits intraneuronal amyloid, gliosis, tau phosphorylation, and neuronal loss. J. Biol. Chem. *285*, 7440–7446.

Richardson, R.L., Kim, E.-M., Shephard, R.A., Gardiner, T., Cleary, J., and O'Hare, E. (2002). Behavioural and histopathological analyses of ibuprofen treatment on the effect of aggregated Abeta(1-42) injections in the rat. Brain Res. *954*, 1–10.

Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 7817–7826.

Roberts, W.A. (2006). Animal memory: episodic-like memory in rats. Curr. Biol. *16*, R601–603.

Rodenbeck, A., Binder, R., Geisler, P., Danker-Hopfe, H., Lund, R., Raschke, F., Weeß, H.-G., and Schulz, H. (2006). A Review of Sleep EEG Patterns. Part I: A Compilation of Amended Rules for Their Visual Recognition according to Rechtschaffen and Kales. Somnologie *10*, 159–175.

Rodriguez, G., Arnaldi, D., and Picco, A. (2011). Brain functional network in Alzheimer's disease: diagnostic markers for diagnosis and monitoring. Int. J. Alzheimers Dis. *2011*, 481903.

Rodríguez-Vázquez, J., Camacho-Arroyo, I., and Velázquez-Moctezuma, J. (2012). Differential impact of REM sleep deprivation on cytoskeletal proteins of brain regions involved in sleep regulation. Neuropsychobiology *65*, 161–167.

Rogers, J., Mastroeni, D., Leonard, B., Joyce, J., and Grover, A. (2007). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? Int. Rev. Neurobiol. *82*, 235–246.

Roh, J.H., Park, M.H., Ko, D., Park, K.-W., Lee, D.-H., Han, C., Jo, S.A., Yang, K.-S., and Jung, K.-Y. (2011). Region and frequency specific changes of spectral power in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol. *122*, 2169–2176.

Roh, J.H., Huang, Y., Bero, A.W., Kasten, T., Stewart, F.R., Bateman, R.J., and Holtzman, D.M. (2012). Disruption of the sleep-wake cycle and diurnal fluctuation of β-amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology. Sci. Transl. Med. *4*, 150ra122.

Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., Reiter, R.J., Valdivia-Velázquez, M., Acosta-Martínez, J.P., and Ortiz, G.G. (2004). Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. J. Neuroimmunol. *150*, 20–28.

Rosen, R.F., Farberg, A.S., Gearing, M., Dooyema, J., Long, P.M., Anderson, D.C., Davis-Turak, J., Coppola, G., Geschwind, D.H., Paré, J.-F., et al. (2008). Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. J. Comp. Neurol. *509*, 259–270.

Rubio, S.E., Vega-Flores, G., Martínez, A., Bosch, C., Pérez-Mediavilla, A., del Río, J., Gruart, A., Delgado-García, J.M., Soriano, E., and Pascual, M. (2012). Accelerated aging of the GABAergic septohippocampal pathway and decreased hippocampal rhythms in a mouse model of Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *26*, 4458–4467.

Ryu, J.K., and McLarnon, J.G. (2008). Thalidomide inhibition of perturbed vasculature and glial-derived tumor necrosis factor-alpha in an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. Neurobiol. Dis. *29*, 254–266.

Sagare, A.P., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2013). Neurovascular defects and faulty amyloid-β vascular clearance in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *33 Suppl 1*, S87–S100.

Salminen, A., Ojala, J., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., and Suuronen, T. (2009). Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors. Prog. Neurobiol. *87*, 181–194.

Sandhu, F.A., Salim, M., and Zain, S.B. (1991). Expression of the human beta-amyloid protein of Alzheimer's disease specifically in the brains of transgenic mice. J. Biol. Chem. *266*, 21331–21334.

Sankaranarayanan, S., Barten, D.M., Vana, L., Devidze, N., Yang, L., Cadelina, G., Hoque, N., DeCarr, L., Keenan, S., Lin, A., et al. (2015). Passive immunization with phospho-tau antibodies reduces tau pathology and functional deficits in two distinct mouse tauopathy models. PloS One *10*, e0125614.

Sarter, M., Bodewitz, G., and Stephens, D.N. (1988). Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. Psychopharmacology (Berl.) *94*, 491–495.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature *400*, 173–177.

Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. Am. J. Pathol. *169*, 599–616.

Schiöth, H.B., Craft, S., Brooks, S.J., Frey, W.H., and Benedict, C. (2012). Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. Mol. Neurobiol. *46*, 4–10.

Schmidt, F.M., Kratzsch, J., Gertz, H.-J., Tittmann, M., Jahn, I., Pietsch, U.-C., Kaisers, U.X., Thiery, J., Hegerl, U., and Schönknecht, P. (2013). Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (MCH) and hypocretin-1 (HCRT-1, orexin-A) in Alzheimer's disease. PloS One *8*, e63136.

Schraen-Maschke, S., Sergeant, N., Dhaenens, C.-M., Bombois, S., Deramecourt, V., Caillet-Boudin, M.-L., Pasquier, F., Maurage, C.-A., Sablonnière, B., Vanmechelen, E., et al. (2008). Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. Biomark. Med. *2*, 363–384.

Scott, L., Feng, J., Kiss, T., Needle, E., Atchison, K., Kawabe, T.T., Milici, A.J., Hajós-Korcsok, E., Riddell, D., and Hajós, M. (2012). Age-dependent disruption in hippocampal θ oscillation in amyloid-β overproducing transgenic mice. Neurobiol. Aging *33*, 1481.e13–e23.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *20*, 11–21.

Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science *298*, 789–791.

Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L., and Cork, L.C. (1987). Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. Science *235*, 873–877.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 2866–2875.

Shen, Y.X., Xu, S.Y., Wei, W., Sun, X.X., Liu, L.H., Yang, J., and Dong, C. (2002). The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. J. Pineal Res. *32*, 85–89.

Shevtsova, Z., Malik, J.M.I., Michel, U., Bähr, M., and Kügler, S. (2005). Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. Exp. Physiol. *90*, 53–59.

Shi, J., Perry, G., Smith, M.A., and Friedland, R.P. (2000). Vascular abnormalities: the insidious pathogenesis of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *21*, 357–361.

Shin, J. (2010). Theta rhythm heterogeneity in humans. Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol. *121*, 456–457.

Siok, C.J., Rogers, J.A., Kocsis, B., and Hajós, M. (2006). Activation of alpha7 acetylcholine receptors augments stimulation-induced hippocampal theta oscillation. Eur. J. Neurosci. *23*, 570–574.

Siok, C.J., Taylor, C.P., and Hajós, M. (2009). Anxiolytic profile of pregabalin on elicited hippocampal theta oscillation. Neuropharmacology *56*, 379–385.

Sipos, E., Kurunczi, A., Kasza, A., Horváth, J., Felszeghy, K., Laroche, S., Toldi, J., Párducz, A., Penke, B., and Penke, Z. (2007). Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. Neuroscience *147*, 28–36.

Sitaram, N., Wyatt, R.J., Dawson, S., and Gillin, J.C. (1976). REM sleep induction by physostigmine infusion during sleep. Science *191*, 1281–1283.

Sitaram, N., Moore, A.M., and Gillin, J.C. (1978). Induction and resetting of REM sleep rhythm in normal man by arecholine: blockade by scopolamine. Sleep *1*, 83–90.

Small, S.A., Schobel, S.A., Buxton, R.B., Witter, M.P., and Barnes, C.A. (2011). A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 585–601.

Smith, C. (1996). Paradoxical sleep deprivation and sleep recording following training in a brightness discrimination avoidance task in Sprague-Dawley rats: paradoxical effects. Neurobiol. Learn. Mem. *66*, 283–294.

Smith, C.T., Conway, J.M., and Rose, G.M. (1998). Brief paradoxical sleep deprivation impairs reference, but not working, memory in the radial arm maze task. Neurobiol. Learn. Mem. *69*, 211–217.

Song, D.K., Im, Y.B., Jung, J.S., Cho, J., Suh, H.W., and Kim, Y.H. (2001). Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice. J. Neurochem. *76*, 1326–1335.

Soto, M., Reynish, E., Nourhashémi, F., and Vellas, B. (2007). [Clinical aspects of Alzheimer disease]. Presse Médicale Paris Fr. 1983 *36*, 1491–1499.

Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc. *7*, 280–292.

Spires, T.L., Orne, J.D., SantaCruz, K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Ashe, K.H., and Hyman, B.T. (2006). Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. Am. J. Pathol. *168*, 1598–1607.

Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., et al. (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. Am. J. Pathol. *155*, 2153–2165.

Squire, L.R., Stark, C.E.L., and Clark, R.E. (2004). The medial temporal lobe. Annu. Rev. Neurosci. *27*, 279–306.

Srivareerat, M., Tran, T.T., Salim, S., Aleisa, A.M., and Alkadhi, K.A. (2011). Chronic nicotine restores normal Aβ levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in Aβ rat model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *32*, 834–844.

Stepan, J., Dine, J., and Eder, M. (2015). Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. Front. Neurosci. *9*, 160.

Stéphan, A., and Phillips, A.G. (2005). A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. Genes Brain Behav. *4*, 157–172.

Stern, Y. (2009). Cognitive reserve. Neuropsychologia *47*, 2015–2028.

Stern, E.A., Bacskai, B.J., Hickey, G.A., Attenello, F.J., Lombardo, J.A., and Hyman, B.T. (2004). Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid-beta plaques. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 4535–4540.

Sterniczuk, R., Dyck, R.H., Laferla, F.M., and Antle, M.C. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes. Brain Res. *1348*, 139–148.

Stevens, L.M., and Brown, R.E. (2015). Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: a cross-sectional study. Behav. Brain Res. *278*, 496–505.

Stranahan, A.M., Haberman, R.P., and Gallagher, M. (2011). Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *21*, 392–400.

Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. J. Biol. Chem. *286*, 4566–4575.

Sun, J., Feng, X., Liang, D., Duan, Y., and Lei, H. (2012). Down-regulation of energy metabolism in Alzheimer's disease is a protective response of neurons to the microenvironment. J. Alzheimers Dis. JAD *28*, 389–402.

Sun, L., Wang, X., Liu, S., Wang, Q., Wang, J., Bennecib, M., Gong, C.-X., Sengupta, A., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2005). Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat. FEBS Lett. *579*, 251–258.

Sureda, F.X., Gutierrez-Cuesta, J., Romeu, M., Mulero, M., Canudas, A.M., Camins, A., Mallol, J., Pallàs, M. (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. Exp. Gerontol. *41*, 360-367.

Sutherland, R.J., and McDonald, R.J. (1990). Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. Behav. Brain Res. *37*, 57–79.

Szczodry, O., van der Staay, F.J., and Arndt, S.S. (2014). Modelling Alzheimer-like cognitive deficits in rats using biperiden as putative cognition impairer. Behav. Brain Res. *274*, 307–311.

Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K. (1997). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. Exp. Gerontol. *32*, 105-109.

Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., Shimada, A., Kimura, J., Takeda, T. (1993). Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. Am. J. Pathol. *142*, 1887-1897.

Takeuchi, A., Irizarry, M.C., Duff, K., Saido, T.C., Hsiao Ashe, K., Hasegawa, M., Mann, D.M., Hyman, B.T., and Iwatsubo, T. (2000). Age-related amyloid beta deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid beta precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. Am. J. Pathol. *157*, 331–339.

Tang, S.-C., Lathia, J.D., Selvaraj, P.K., Jo, D.-G., Mughal, M.R., Cheng, A., Siler, D.A., Markesbery, W.R., Arumugam, T.V., and Mattson, M.P. (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. Exp. Neurol. *213*, 114–121.

Tang, Y., Yamada, K., Kanou, Y., Miyazaki, T., Xiong, X., Kambe, F., Murata, Y., Seo, H., and Nabeshima, T. (2000). Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats. Brain Res. Mol. Brain Res. *80*, 188–197.

Tapp, P.D., Siwak, C.T., Gao, F.Q., Chiou, J.-Y., Black, S.E., Head, E., Muggenburg, B.A., Cotman, C.W., Milgram, N.W., and Su, M.-Y. (2004). Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 8205–8213.

Terao, A., Apte-Deshpande, A., Dousman, L., Morairty, S., Eynon, B.P., Kilduff, T.S., and Freund, Y.R. (2002). Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. J. Neuroimmunol. *132*, 99–112.

Terry, A.V. (2009). Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, J.J. Buccafusco, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press),.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann. Neurol. *30*, 572–580.

Terwel, D., Muyllaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., and Van Leuven, F. (2008). Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. Am. J. Pathol. *172*, 786–798.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology *58*, 1791–1800.

Tian, H., Davidowitz, E., Lopez, P., Emadi, S., Moe, J., and Sierks, M. (2013). Trimeric tau is toxic to human neuronal cells at low nanomolar concentrations. Int. J. Cell Biol. *2013*, 260787.

Tian, Q., Lin, Z.-Q., Wang, X.-C., Chen, J., Wang, Q., Gong, C.-X., and Wang, J.-Z. (2004). Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. Neuroscience *126*, 277–284.

Timofeeva, O.A., Eddins, D., Yakel, J.L., Blackshear, P.J., and Levin, E.D. (2010). Hippocampal infusions of MARCKS peptides impair memory of rats on the radial-arm maze. Brain Res. *1308*, 147–152.

Toledano, A., Alvarez, M.I., López-Rodríguez, A.B., Toledano-Díaz, A., and Fernández-Verdecia, C.I. (2012). [Does Alzheimer's disease exist in all primates? Alzheimer pathology in non-human primates and its pathophysiological implications (I)]. Neurol. Barc. Spain *27*, 354–369.

la Torre, J.C. de (2002). Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. Stroke J. Cereb. Circ. *33*, 1152–1162.

la Torre, J.C. de, and Stefano, G.B. (2000). Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. Brain Res. Brain Res. Rev. *34*, 119–136.

Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. J. Physiol. *572*, 477–492.

Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P.M., and Arancio, O. (2004). Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. Ann. Neurol. *55*, 801–814.

Tsigelny, I.F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G.M., Sharikov, Y., Mizuno, H., Spencer, B., Rockenstein, E., Trejo, M., Platoshyn, O., et al. (2008). Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. PloS One *3*, e3135.

Tsolaki, A., Kazis, D., Kompatsiaris, I., Kosmidou, V., and Tsolaki, M. (2014). Electroencephalogram and Alzheimer's disease: clinical and research approaches. Int. J. Alzheimers Dis. *2014*, 349249.

Tsutajima, J., Kunitake, T., Wakazono, Y., and Takamiya, K. (2013). Selective injection system into hippocampus CA1 via monitored theta oscillation. PloS One *8*, e83129.

Tulving, E. (1987). Multiple memory systems and consciousness. Hum. Neurobiol. *6*, 67–80.

Umeda, Y., Taniguchi, S., Arima, K., Piao, Y.-S., Takahashi, H., Iwatsubo, T., Mann, D., and Hasegawa, M. (2004). Alterations in human tau transcripts correlate with those of neurofilament in sporadic tauopathies. Neurosci. Lett. *359*, 151–154.

Unger, J., McNeill, T.H., Moxley, R.T., White, M., Moss, A., and Livingston, J.N. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. Neuroscience *31*, 143–157.

Utton, M.A., Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. J. Cell Sci. *118*, 4645–4654.

Vega-Flores, G., Gruart, A., and Delgado-García, J.M. (2014). Involvement of the GABAergic septo-hippocampal pathway in brain stimulation reward. PloS One *9*, e113787.

Vertes, R.P. (2005). Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. Hippocampus *15*, 923–935.

Villette, V., Poindessous-Jazat, F., Simon, A., Léna, C., Roullot, E., Bellessort, B., Epelbaum, J., Dutar, P., and Stéphan, A. (2010). Decreased rhythmic GABAergic septal activity and memory-associated theta oscillations after hippocampal amyloid-beta pathology in the rat. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 10991–11003.

Vingtdeux, V., Sergeant, N., and Buée, L. (2012). Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. Front. Physiol. *3*, 229.

Vogel, J.R., Hughes, R.A., and Carlton, P.L. (1967). Scopolamine, atropine and conditioned fear. Psychopharmacologia *10*, 409–416.

Voronkov, M., Braithwaite, S.P., and Stock, J.B. (2011). Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease. Future Med. Chem. *3*, 821–833.

Walls, K.C., Ager, R.R., Vasilevko, V., Cheng, D., Medeiros, R., and LaFerla, F.M. (2014). p-Tau immunotherapy reduces soluble and insoluble tau in aged 3xTg-AD mice. Neurosci. Lett. *575*, 96–100.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature *416*, 535–539.

Walsh, D.M., Townsend, M., Podlisny, M.B., Shankar, G.M., Fadeeva, J.V., Agnaf, O. El, Hartley, D.M., and Selkoe, D.J. (2005). Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *25*, 2455–2462.

Wang, J.-Z., and Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. Prog. Neurobiol. *85*, 148–175.

Wang, Q., and Wang, J. (2002). Injection of bradykinin or cyclosporine A to hippocampus induces Alzheimer-like phosphorylation of Tau and abnormal behavior in rats. Chin. Med. J. (Engl.) *115*, 884–887.

Wang, H., Megill, A., He, K., Kirkwood, A., and Lee, H.-K. (2012). Consequences of Inhibiting Amyloid Precursor Protein Processing Enzymes on Synaptic Function and Plasticity. Neural Plast. *2012*.

Wang, J., Ikonen, S., Gurevicius, K., van Groen, T., and Tanila, H. (2002). Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene. Brain Res. *943*, 181–190.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Imaki, H., Wegiel, J., Mehta, P.D., Silverman, W.P., Reisberg, B., et al. (2007). Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. Acta Neuropathol. (Berl.) *113*, 389–402.

Wesson, D.W., Borkowski, A.H., Landreth, G.E., Nixon, R.A., Levy, E., and Wilson, D.A. (2011). Sensory network dysfunction, behavioral impairments, and their reversibility in an Alzheimer's β-amyloidosis mouse model. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 15962–15971.

West, M.J. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. Neurobiol. Aging *14*, 287–293.

Whishaw, I.Q., Metz, G.A., Kolb, B., and Pellis, S.M. (2001). Accelerated nervous system development contributes to behavioral efficiency in the laboratory mouse: a behavioral review and theoretical proposal. Dev. Psychobiol. *39*, 151–170.

Whitwell, J.L., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Petersen, R.C., and Jack, C.R. (2007). 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. Brain J. Neurol. *130*, 1777–1786.

Wilson, A.C., Dugger, B.N., Dickson, D.W., and Wang, D.-S. (2011). TDP-43 in aging and Alzheimer's disease - a review. Int. J. Clin. Exp. Pathol. *4*, 147–155.

Wilson, R.S., Arnold, S.E., Schneider, J.A., Kelly, J.F., Tang, Y., and Bennett, D.A. (2006). Chronic psychological distress and risk of Alzheimer's disease in old age. Neuroepidemiology *27*, 143–153.

Winkler, J., Connor, D.J., Frautschy, S.A., Behl, C., Waite, J.J., Cole, G.M., and Thal, L.J. (1994). Lack of long-term effects after beta-amyloid protein injections in rat brain. Neurobiol. Aging *15*, 601–607.

Winson, J. (1978). Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. Science *201*, 160–163.

Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W., and Martins, R. (2002). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, RC221.

Xu, L.-S., Fan, Y.-Y., He, P., Zhang, W.-P., Hu, W.-W., and Chen, Z. (2009). Ameliorative effects of histamine on spatial memory deficits induced by scopolamine infusion into bilateral dorsal or ventral hippocampus as evaluated by the radial arm maze task. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *36*, 816–821.

Yamada, K., Tanaka, T., Zou, L.B., Senzaki, K., Yano, K., Osada, T., Ana, O., Ren, X., Kameyama, T., and Nabeshima, T. (1999). Long-term deprivation of oestrogens by ovariectomy potentiates beta-amyloid-induced working memory deficits in rats. Br. J. Pharmacol. *128*, 419–427.

Yamada, M., Chiba, T., Sasabe, J., Nawa, M., Tajima, H., Niikura, T., Terashita, K., Aiso, S., Kita, Y., Matsuoka, M., et al. (2005). Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory. Behav. Brain Res. *164*, 139–146.

Yang, L.S., and Ksiezak-Reding, H. (1995). Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. Eur. J. Biochem. FEBS *233*, 9–17.

Yesavage, J.A., Friedman, L., Ancoli-Israel, S., Bliwise, D., Singer, C., Vitiello, M.V., Monjan, A.A., and Lebowitz, B. (2003). Development of diagnostic criteria for defining sleep disturbance in Alzheimer's disease. J. Geriatr. Psychiatry Neurol. *16*, 131–139.

Yoshiyama, Y., Zhang, B., Bruce, J., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2003). Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 10662–10671.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. Neuron *53*, 337–351.

Younkin, S.G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. J. Physiol. Paris *92*, 289–292.

Zeng, K.-W., Wang, X.-M., Ko, H., Kwon, H.C., Cha, J.W., and Yang, H.O. (2011). Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid β-protein via the PI3K/Akt/Bad/Bcl(XL)-regulated mitochondrial apoptotic pathway. Eur. J. Pharmacol. *672*, 45–55.

Zhang, B., Veasey, S.C., Wood, M.A., Leng, L.Z., Kaminski, C., Leight, S., Abel, T., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2005). Impaired rapid eye movement sleep in the Tg2576 APP murine model of Alzheimer's disease with injury to pedunculopontine cholinergic neurons. Am. J. Pathol. *167*, 1361–1369.

Zhang, F., Zhu, Z.Q., Liu, D.X., Zhang, C., Gong, Q.H., Zhu, Y.H. (2014). Emulsified isoflurane anesthesia decreases brain-derived neurotrophic factor expression and induces cognitive dysfunction in adult rats. Exp. Ther. Med. *8*, 471–477.

Zou, K., Kim, D., Kakio, A., Byun, K., Gong, J.-S., Kim, J., Kim, M., Sawamura, N., Nishimoto, S., Matsuzaki, K., et al. (2003). Amyloid beta-protein (Abeta)1-40 protects neurons from damage induced by Abeta1-42 in culture and in rat brain. J. Neurochem. *87*, 609–619.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par un déclin progressif des fonctions cognitives avec une détérioration de la mémoire, une atrophie cérébrale et deux lésions histologiques caractéristiques retrouvées lors d'examens post-mortem : les plaques extracellulaires de peptide β-amyloïde et les enchevêtrements intracellulaires de la protéine Tau anormalement phosphorylée. De nombreux modèles animaux de la MA ont été développés afin de comprendre et de tester différents traitements dirigés contre cette pathologie. Cependant, aucun modèle de rongeur non transgénique, développant à la fois les plaques amyloïdes et la pathologie neurofibrillaire, n'est disponible à ce jour. L'objectif de cette étude est de développer le premier modèle non transgénique, développant les deux lésions histologiques caractéristiques de la MA chez le rat. Le principe consiste à réaliser une injection concomitante et intrahippocampale d'un AAV (virus associé aux adénovirus) recombinant contenant le gène humain de la protéine Tau présentant la mutation P301L, et du peptide Aβ1-42 qui est le principal composant des plaques amyloïdes. Après plusieurs expériences, nous avons obtenu un modèle animal représentatif des stades précoces de la MA, c'est-à-dire avec des lésions focalisées dans l'une des premières structures du cerveau affectée par la MA : l'hippocampe. La présence des deux lésions histopathologiques caractéristiques de la maladie, accompagnée d'une astrocytose, a été observée par immunohistofluorescence. Une détérioration de la mémoire concernant plus particulièrement la mémoire de travail, ainsi que des anormalités de l'activité électrique cérébrale et notamment durant les phases de sommeil paradoxal, enregistrées par électroencéphalographie, ont également été mises en évidence.

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive decline in cognitive function with a memory impairment, a brain atrophy, and two histological hallmarks observed from post-mortem examination: extracellular β-amyloid plaques and intracellular tangles of the Tau protein abnormally phosphorylated. Numerous animal models of AD have been developed to understand and to test drugs against this pathology. However, any non-transgenic model of rodent developing amyloid plaques and the neurofibrilary pathology is currently available. The aim of this study is to develop the first non-transgenic model producing the two histopathological features of AD in the rat. The principle is to perform a concomitant intrahippocampal injection of a recombinant AAV (Adeno-Associated Virus) containing the human transgene tau with the P301L mutation, and of Aβ1-42 peptide, the main component of the amyloid plaques. After several experiments, we have obtained an animal model representative of the early steps of AD, i.e. with lesions focalized in one of the first affected brain structures in the AD: the hippocampus. The presence of the two histopathological hallmarks has been observed by immunohistofluorescence and associated with an astrogliosis. A memory impairment concerning more particulary the working memory, and abnormalities of the electrical activity of the brain and of the rapid eye movement sleep recorded by electroencephalography, are also characterized.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer ; Modèle animal expérimental ; Peptide β-amyloïde ; Protéine Tau ; Electroencéphalographie ; Sommeil paradoxal ; Mémoire de travail ; Mémoire de référence.

Keywords: Alzheimer's disease ; Experimental animal model ; Amyloid beta peptide ; Tau protein ; Electroencephalography ; Rapid eye movement sleep ; Working memory ; Reference memory.