



HAL
open science

Etude des mécanismes neuro-inflammatoires impliqués dans la clairance amyloïde induite par des perméabilisations physiques répétées de la barrière hémato-encéphalique chez les rongeurs modèles de la maladie d'Alzheimer

Vénétia Cardona

► **To cite this version:**

Vénétia Cardona. Etude des mécanismes neuro-inflammatoires impliqués dans la clairance amyloïde induite par des perméabilisations physiques répétées de la barrière hémato-encéphalique chez les rongeurs modèles de la maladie d'Alzheimer. Médecine vétérinaire et santé animale. 2019. dumas-04871380

HAL Id: dumas-04871380

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04871380v1>

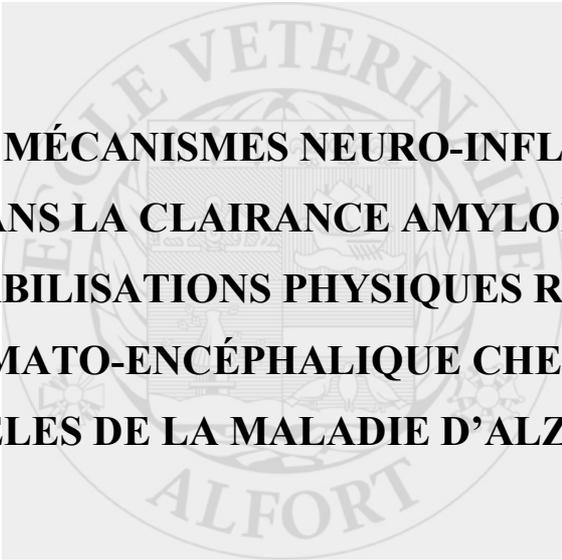
Submitted on 7 Jan 2025

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

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

Copyright

Année 2019



**ÉTUDE DES MÉCANISMES NEURO-INFLAMMATOIRES
IMPLIQUÉS DANS LA CLAIRANCE AMYLOÏDE INDUITE PAR
DES PERMÉABILISATIONS PHYSIQUES RÉPÉTÉES DE LA
BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE CHEZ LES RONGEURS
MODÈLES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 15/01/2019

par

Venetia, Laurence, Pauline CARDONA

JURY

Président : Pr. Rouard

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directrice : Pr Fanny Pilot-Storck

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Pr Stéphane Blot

Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort

Liste des membres du corps enseignant

Directeur : Pr Christophe Degueurce

Directeur des formations : Pr Henry Chateau

Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint :** Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée - Dr Verwaerde Patrick, Maître de conférences (convention EnvT) <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigié Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Herout Valentin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchekroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guéneq Christelle, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint :** Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Augustin Jean-Christophe* - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent <p>Unité pédagogique de maladies règlementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Aline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
--	--

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint :** Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagree Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences * <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences 	<p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticien hospitalier (rattaché au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Véronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié
---	--

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites :

Mmes et MM. : Bénét Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Enriquez Brigitte, Niebauer Gert, Panthier Jean-Jacques, Paragon Bernard.

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommage respectueux.

Au Professeur Fanny Pilot-Storck,

Pour avoir accepté de diriger ce travail, en plus de votre infinie gentillesse et votre dévouement. Pour avoir été ma référente dans ce travail, mais également dans mon projet professionnel, merci pour vos précieux conseils et votre temps.

Mes remerciements les plus chaleureux et sincères.

Au Professeur Stéphane Blot,

Pour avoir accepté d'être mon assesseur, pour votre relecture attentive, et l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Sincères remerciements.

Aux Docteurs Benoit Larrat et Charles Truillet,

Pour m'avoir encadrée, formée et soutenue pour mon projet de Ph.D. durant ces six derniers mois.

Mes remerciements les plus sincères.

Au Docteur Michel Bottlaender,

Pour m'avoir si bien préparée et soutenue pour le concours de l'École Doctorale, et pour avoir accepté de diriger mon doctorat.

Mes remerciements les plus sincères.

À toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail,

À Émilie Jaumain, Benoît Jego, Françoise Geffroy, Erwan Selingue,

Pour tout ce que vous m'avez appris, et pour tout ce que vous allez encore m'apprendre.

À Matthieu Gerstenmayer,

Pour m'avoir encadrée durant mon Master et m'avoir permis de prendre la relève de ton travail.

À Pauline Agou, Laura Mouton, Jacques Stout, Solenne Vaillant mes futurs co-thésards,

Que nos années à venir soient riches d'expériences scientifiques.

À mes parents,

Merci pour votre soutien et vos encouragements durant ces longues années d'études.

À mon frère jumeau, Louis-Marie,

Que notre complicité dure pour toujours.

À tous mes amis de l'École Vétérinaire,

Ces cinq années passées à vos côtés ont été merveilleuses, merci de m'avoir permis de garder avec moi ces précieux souvenirs.

À Touki,

À mon alter-ego félin, pour avoir toujours été à mes côtés durant ces longues nuits et journées de révision.

Pour avoir été ma source de bonne humeur et de motivation,

Que ton poil si doux puisse m'accompagner encore de longues années !

À Stéphane, mon mari,

Pour ton soutien sans faille dans tout ce que j'entreprends, pour la confiance et l'estime que tu portes à mon travail et à ma personnalité,

Puisse notre vie à deux être éternelle, et mon amour pour toi infini.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
<i>LISTE DES FIGURES</i>	3
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE : LA MALADIE D'ALZHEIMER, DE LA NÉCESSITÉ DE TROUVER DES TRAITEMENTS	13
1. <i>Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer</i>	15
1.1. La maladie d'Alzheimer à l'échelle de l'individu	15
1.1.1. Expression clinique de la maladie.....	15
1.1.2. Diagnostic de la maladie	16
1.2. La maladie d'Alzheimer à l'échelle cellulaire et moléculaire	19
1.2.1. Physiopathologie de la maladie.....	19
1.2.2. Étiologie des lésions A β	20
1.2.3. Étiologie des lésions tau	21
1.3. Théorie de la cascade amyloïde et formation des plaques amyloïdes.....	24
2. <i>Épidémiologie</i>	27
2.1. Étude Paquid (Personne âgée quid)	27
2.2. Étude des 3C (Trois Cités).....	30
3. <i>La maladie d'Alzheimer : un défi expérimental et technologique pour les neurosciences</i>	31
3.1. Ce que nous a appris l'exploration non invasive du cerveau.....	32
3.1.1. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	32
3.1.2. La Tomographie par Émission de Positons (TEP).....	35
3.2. L'apport des modèles animaux dans la maladie d'Alzheimer.....	39
4. <i>État actuel des thérapies anti-Alzheimer</i>	42
4.1. Traitements issus de l'hypothèse cholinergique.....	42
4.2. Traitements issus de l'hypothèse amyloïdogénique.....	43
DEUXIÈME PARTIE : NEURO-INFLAMMATION ET MALADIE D'ALZHEIMER	45
1. <i>Caractéristiques générales de la neuro-inflammation</i>	47
1.1. Le système nerveux central, un territoire immunologiquement privilégié	47
1.2. Définition de la neuro-inflammation.....	47
1.3. Protagonistes cellulaires	48
1.3.1. Microglie	48
1.3.1.1. Rôles en conditions physiologiques.....	48
1.3.1.2. Activation microgliale et inflammation	49
1.3.2. Astrocytes	50
2. <i>La neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer</i>	52
2.1. Implication des cellules gliales dans la maladie d'Alzheimer	52
2.2. Les modulateurs de la neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer	55
2.3. Monitoring de la neuro-inflammation : la protéine translocatrice 18 kDa TSPO.....	57
3. <i>La barrière hémato-encéphalique : entre protection et inaccessibilité, une nouvelle piste thérapeutique ?</i>	59

3.1.	Définition et structure de la barrière hémato-encéphalique	59
3.2.	Rôle et fonctions de la barrière hémato-encéphalique.....	61
3.3.	Neuro-inflammation et barrière hémato-encéphalique : implication dans la maladie d'Alzheimer	62
3.4.	Nouveaux horizons thérapeutiques : la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons	64
TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE		67
1.	<i>Contexte et intérêt de l'étude : état de l'art</i>	69
2.	<i>Cadre de l'étude et problématique</i>	70
2.1.	Objectif de l'étude	70
2.2.	Choix du modèle animal : la souris APP _{swe} /PSEN1 _{de9}	71
3.	<i>Matériel et méthodes</i>	72
3.1.	Animaux	72
3.1.1.	Première cohorte	72
3.1.2.	Deuxième cohorte.....	73
3.2.	Design de l'étude	73
3.2.1.	Étude comportementale.....	73
3.2.2.	Investigation longitudinale de la neuro-inflammation	74
3.3.	Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.....	74
3.4.	Études comportementales	75
3.4.1.	Comportement en champ libre ou « <i>Openfield</i> ».....	75
3.4.2.	Comportement en labyrinthe en Y ou « <i>Y maze</i> ».....	76
3.4.3.	Comportement en Labyrinthe de Barnes ou « <i>Barnes maze</i> ».....	77
3.5.	Imagerie TEP et analyse des images.....	78
3.6.	Euthanasie et prélèvement des encéphales.....	81
3.7.	Analyse statistique.....	82
4.	<i>Présentation et Analyse des résultats</i>	82
4.1.	Étude préliminaire : comportement	82
4.1.1.	Comportement en champ libre ou « <i>openfield</i> »	83
4.1.2.	Labyrinthe en Y.....	84
4.1.3.	Labyrinthe de Barnes.....	85
4.2.	Fixation du ¹⁸ F-DPA-714	87
5.	<i>Perspectives</i>	90
5.1.	Quantification de la charge amyloïde et résultats espérés	90
5.1.1.	Objectifs et résultats espérés.....	90
5.1.2.	Matériel et méthodes.....	91
5.1.2.1.	Extraction des protéines.....	91
5.2.1.2.	Western blotting.....	91
5.2.	Autoradiographie et immunohistochimie	92
6.	<i>Discussion</i>	93
CONCLUSION.....		97
BIBLIOGRAPHIE		99
ANNEXES.....		109

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Frise symptomatologique de la maladie d'Alzheimer. D'après Honig et Mayeux, 2001. ...	16
Figure 2 : Clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde « APP » et génération des peptides Aβ. D'après Eehalt <i>et al.</i> , 2003 ; Querfurth et LaFerla, 2010.....	21
Figure 3 : Rôle et altération fonctionnelle de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer. D'après « Alzheimer's Disease ».	22
Figure 4 : Représentation schématique de la conformation en épingle de la protéine tau. D'après Mandelkow <i>et al.</i> , 2007.	23
Figure 5 : Les évènements successifs de la théorie de la cascade amyloïde selon Hardy. D'après Selkoe et Hardy, 2016.	26
Figure 6 : Échelle de Scheltens. Reconstructions d'imagerie par résonance magnétique pondérées T1, coupes coronales. D'après « L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique », 2010....	35
Figure 7 : Principe de la tomographie par émission de positons. D'après Heurling <i>et al.</i> , 2017.....	36
Figure 8 : Images obtenues par tomographie par émission de positons du peptide amyloïde. D'après Mori <i>et al.</i> , 2012.	38
Figure 9 : : États fonctionnels sain et délétère de la microglie. D'après (Salter et Stevens, 2017).....	53
Figure 10 : La protéine translocatrice 18 kDa TSPO. D'après Rupprecht <i>et al.</i> , 2010.	58
Figure 11 : La barrière hémato-encéphalique ou unité neuro-vasculaire. D'après Obermeier <i>et al.</i> , 2013.	60
Figure 12: Implication de la barrière hémato-encéphalique dans la maladie d'Alzheimer. D'après Yamazaki et Kanekiyo, 2017.	63
Figure 13 : Caractérisation phénotypique du modèle APP _{swe} /PS1 _{dE9} . D'après « APP _{swe} /PSEN1 _{dE9} ALZFORUM ».	72

Figure 14 : Protocole réalisé sur la première cohorte d'animaux.	74
Figure 15 : Protocole réalisé sur la deuxième cohorte d'animaux.	74
Figure 16 : Détails du dispositif et de la trajectoire du transducteur.	75
Figure 17 : Détails du dispositif d'« openfield » pour souris présent à NeuroSpin.	76
Figure 18 : Détails du labyrinthe en Y pour souris présent à NeuroSpin.	76
Figure 19 : Détail du labyrinthe de Barnes pour souris présent à NeuroSpin.	77
Figure 20 : Courbe temps-activité obtenue par traitement des images obtenues par tomographie par émission de positons.	80
Figure 21 : Images obtenues par Tomographie par Émission de Positons : fixation du ^{18}F -DPA-714 exprimée en Bq/cc.	81
Figure 22 : Résultats comportementaux obtenus en « openfield ».	83
Figure 23 : Résultats comportementaux obtenus dans le labyrinthe en Y.	84
Figure 24 : Résultats comportementaux obtenus en labyrinthe de Barnes : nombre d'erreurs effectuées pour trouver « l'escape box ».	86
Figure 25 : Résultats comportementaux obtenus en labyrinthe de Barnes : distance parcourue jusqu'à « l'escape box », le dernier jour du test de rétention R4.	86
Figure 26: Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 (a) dans le cortex et l'hippocampe (b) dans les régions subcorticales, exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).	89
Figure 27 : Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 (a) dans le cortex et l'hippocampe (b) dans les régions subcorticales, exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).	89
Figure 28 : Immunohistochimie réalisée à NeuroSpin au cours de cette étude.	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence des démences en fonction de l'âge et du sexe sur 1461 sujets de plus de 75 ans de la cohorte Paquid. D'après Helmer <i>et al.</i> , 2006.....	28
Tableau 2 : Facteurs de risque et protecteurs identifiés chez les sujets de la cohorte Paquid. D'après Dartigues <i>et al.</i> , 2012.....	29
Tableau 3 : L'imagerie par Résonance Magnétique dans les critères de diagnostic des démences. D'après « L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique », 2010.	34

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% ID/cc	« Percentage Injected Dose per cubic centimeter »
3C	Étude des 3 Cités
A1/A2	Astrocyte classique/Astrocyte alternatif
AD	« Alzheimer's Disease »
ADL	« Activities of Daily Living »
AICD	« Amyloid IntraCellular Domain »
ANT	« Adenine Nucleotide Translocase »
APLP	« Amyloid Peptide Like Protein »
APOE	APolipoprotéine E
APP	« Amyloid Peptide Precursor »
AQP4	AQuaPorine 4
ARN	Acide RiboNucléique
A β	Amyloïde bêta
BACE-1	« Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 »
BCA	« BiCinchoninic acid Assay »
BDNF	« Brain-Derived Neurotrophic Factor »
bFGF	« Basic Fibroblast Growth Factor »
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
C1q	« Complement component 1q »
CCL2/3	« Chemokine Ligand 2/3 »
CD11b	« Cluster of Differentiation 11b » (ou ITGAM « InTeGrine Alpha M »)
CD68	« Cluster of Differentiation 68 »
CEA	Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAD	« Disability Assessment for Dementia »
DAMP	« Danger Associated Molecular Patterns »
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire
DPA-714	« <i>N</i> -diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidine-3-acetamide »
DSM-IV	« Diagnostic and Stat Manual of Mental Disorders »

ECE	« Endothelin Converting Enzyme »
GFAP	« Glial Fibrillary Acidic Protein »
HAS	Haute Autorité de Santé
IADL	« Instrumental Activities of Daily Living »
Iba1	« Ionized calcium Binding Adapter molecule 1 »
IDE	« Insulin Degrading Enzyme »
IL	InterLeukine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRM FLAIR	Imagerie par Résonance Magnétique Fluid Attenuated Inversion Recovery
LCS	Liquide Cérébro-Spinal
LRP1	« Low density lipoprotein Receptor related Protein 1 »
M1/M2	Macrophage Classique/Macrophage alternatif
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	« Microtubule Associated Protein »
MAPT	« Microtubule Associated Protein Tau »
MCI	« Mild Cognitive Impairment »
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MMSE	« Mini-Mental State Examination »
MTA-scale	« Medial Temporal lobe Atrophy scale »
NINDS-AIREN	« National Institute of Neurological Disorders and Stroke » / Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences
NMDA	« N-Methyl-D-Aspartic Acid »
NO	Monoxyde d'azote
NPI	« NeuroPsychiatric Inventory »
NUV _{cb}	« Normalized to the cerebellum Uptake Values »
OSEM 2D	« Ordered-Subsets-Expectation-Maximization 2 Dimensions »
PAMP	« Pathogen Associated Molecular Patterns »
Paquid	Personne Âgée Quid
PBR	« Peripheral Benzodiazepine Receptor »
PCR	« Polymerase Chain Reaction »

PgP	« Permeability-GlycoProtein »
PHF	« Paired Helical Filament »
PIB	« Pittsburgh Compound B »
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
PRR	« Pathogen Recognition Receptor »
PSEN1 (PS1)	Préséniline 1
PSEN2 (PS2)	Préséniline 2
PVDF	PolyFluorure de VinyliDène
RAGE	« Receptor for Advanced Glycation End products »
ROI	« Region Of Interest »
SD	« Standart Deviation »
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	« Standart Error of the Mean »
SHFJ	Service Hospitalier Frédéric Joliot
SNC	Système Nerveux Central
SUV	« Standardized Uptake Value » ou Valeur de fixation normalisée
Tau	« Tubuline-Associated Unit »
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TGF	« Transforming Growth Factor »
TLR2/TLR4	« Toll Like Receptor 2/4 »
TNF	« Tumor Necrosis Factor »
TREM2	« Triggering Receptor Expressed on Myeloid cell 2 »
TSPO	« TranSlocator Protein 18 kDa »
UNV	Unité Neuro-Vasculaire
US	Ultrasons
VDAC	« Voltage Dependant Anion Channel »
VEGF	« Vascular Endothelial Growth Factor »

INTRODUCTION

À première vue, le système nerveux et le système immunitaire ont peu de traits communs. Le système immunitaire est en perpétuel renouvellement et remaniement ; à l'opposé, le système nerveux est hautement régulé autour d'une homéostasie inflexible. Ils sont de plus ségrégués l'un de l'autre par la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui confère au système nerveux central le statut de « territoire immunologiquement privilégié ». Cette barrière ne prévient pas seulement de l'entrée de tous pathogènes ou cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral, elle exclut également une grande partie des molécules thérapeutiques susceptibles d'atteindre le tissu cérébral. Il a longtemps été pris pour acquis que le maintien de l'imperméabilité de cette barrière était essentiel au bon fonctionnement du système nerveux et que son ouverture était un phénomène pathologique. Cependant, cette réduction oublie que des échanges actifs ont lieu entre le sang et le cerveau, en conditions physiologiques.

L'utilisation récente des ultrasons pour l'ouverture de la BHE a pu apporter des solutions techniques pour la délivrance focalisée de molécules thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives. Il est alors apparu que l'ouverture de la BHE pouvait être à l'origine d'un passage plus important des molécules thérapeutiques administrées, mais que cette ouverture pouvait également être à l'origine d'une soustraction de molécules néfastes pour le système nerveux, comme les peptides A β dans la maladie d'Alzheimer. Ce dernier point a été l'objet de cette étude menée conjointement à NeuroSpin et au Service Hospitalier Frédéric Joliot, sous la direction de Benoit Larrat et de Charles Truillet. L'utilisation de la tomographie par émission de positons chez des souris modèles de la maladie d'Alzheimer ayant subi un protocole de perméabilisation répétée de la BHE par ultrasons nous a permis de tester l'hypothèse d'une neuro-inflammation thérapeutique déclenchée par les ultrasons et à l'origine d'une clairance amyloïde.

**PREMIÈRE PARTIE : LA MALADIE
D'ALZHEIMER, DE LA NÉCESSITÉ DE
TROUVER DES TRAITEMENTS**

1. Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer

1.1. La maladie d'Alzheimer à l'échelle de l'individu

1.1.1. Expression clinique de la maladie

La maladie d'Alzheimer est définie comme une démence dite dégénérative et se caractérise cliniquement par l'association de troubles cognitifs et comportementaux (Kumar et Tsao, 2018).

Les troubles de la mémoire d'abord à court terme puis à long terme sont les symptômes les plus connus de la maladie d'Alzheimer. Elle s'accompagne d'une désorientation spatio-temporelle, de difficultés pour trouver ses mots et pour la réalisation de certains gestes, ainsi que des troubles du comportements (apathie, dépression, agressivité, délire, ...). Classiquement, la maladie d'Alzheimer touche des personnes de plus de 65 ans, et démarre par l'apparition progressive de difficultés dans la réalisation de certaines tâches cognitives mobilisant la mémoire de travail, comme la réalisation de calculs, l'orientation visuo-spatiale et le langage.

Durant cette phase initiale dite pré-déméntielle, les oublis bénins, le manque d'attention, ou encore les sautes d'humeur peuvent passer relativement inaperçus ou passer pour des symptômes normaux du vieillissement ou stress (Dubois, 2009).

Tandis que la maladie progresse du stade léger à intermédiaire (Figure 1), les déficits mnésiques et les atteintes cognitives s'intensifient, et la progression de ces symptômes permet d'établir le diagnostic de la maladie. L'évolution des symptômes conduit progressivement à la perte d'indépendance du patient. Finalement, l'apparition d'atteintes motrices et de troubles de la coordination ainsi que la difficulté à communiquer (aphasie/paraphasie) entraînent le repliement du patient, et les atteintes comportementales et neuropsychiatriques deviennent prépondérantes.

Alors que le patient oublie progressivement son passé et ne reconnaît plus ses amis et sa famille, ces périodes de grande confusion se caractérisent également par la perte de conscience par les patients de leur maladie (Honig et Mayeux, 2001).

La phase ultime de la maladie mène le patient vers une perte quasi-totale de la parole, une grande fatigue et une incapacité motrice nécessitant une aide constante.

Le patient est alité et présente des difficultés à manger et à avaler. Cette phase se termine par le décès de la personne, souvent à la suite de complications secondaires comme une pneumonie (Sheehan, 2012).

Figure 1 : Frise symptomatologique de la maladie d'Alzheimer. D'après Honig et Mayeux, 2001.



1.1.2. Diagnostic de la maladie

Du fait de l'absence de marqueurs biologiques de certitude de la maladie d'Alzheimer, son diagnostic est probabiliste par élimination des autres causes possibles de démence, rendant l'acceptation du diagnostic difficile pour le patient et l'entourage. L'établissement du diagnostic de la maladie est complexe lorsqu'il intervient aux deux extrémités de l'évolution de la maladie. Au début de l'installation de la maladie d'Alzheimer, les symptômes sont discrets et passent pour des signes habituels du vieillissement. Dans les phases avancées et ultimes de la maladie, les altérations décelées à l'examen ne sont plus spécifiques d'une démence en particulier, et ne permettent pas de diagnostiquer une démence d'Alzheimer, (Dubois, 2009).

La maladie d'Alzheimer est la cause principale de syndrome démentiel. Cependant, d'autres causes neurodégénératives peuvent être à l'origine d'un syndrome démentiel :

- la démence vasculaire ;
- la démence à corps de Lewy ;
- la démence compliquant la maladie de Parkinson ;
- la dégénérescence lobaire fronto-temporale, *etc.*

En 2011, la Haute Autorité de Santé (HAS) a publié ses recommandations pour le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (« Maladie d'Alzheimer et maladie apparentées : diagnostic et prise en charge. », 2011).

Selon la HAS, la démarche diagnostique doit comporter :

- un examen clinique, afin d'évaluer l'état général et cardiovasculaire et de rechercher une éventuelle confusion mentale ou des déficits sensoriels. L'examen neurologique reste souvent normal dans le cas d'une maladie d'Alzheimer ;
- un entretien avec le patient et un proche de celui-ci ;

- une évaluation fonctionnelle, qui doit permettre d'apprécier les conséquences des troubles cognitifs sur la vie quotidienne. Plusieurs échelles peuvent être utilisées pour quantifier l'impact sur la vie quotidienne : l'échelle « Instrumental Activities of Daily Living » (IADL) pour les activités instrumentales ; l'échelle « Activities of Daily Living » (ADL) pour les activités basiques ; le « Disability Assessment for Dementia » (DAD) peut également être utilisé ;
- une évaluation cognitive globale, à l'aide du « Mini-Mental State Examination » (MMSE), (Sheehan, 2012) ;
- une évaluation psychique et comportementale, recherchant une dépression selon les critères « Diagnostic and Stat Manual of Mental Disorders » (DSM-IV-TR). Cet entretien doit pouvoir déceler des troubles affectifs, comportementaux ou d'expression psychiatrique, et peut être structuré à l'aide d'échelle telles que le « NeuroPsychiatric Inventory » (NPI) ;
- une évaluation neuropsychologique du patient. Elle permet d'évaluer tout particulièrement la mémoire épisodique, la mémoire sémantique, les fonctions exécutives, l'attention et les fonctions instrumentales ;
- des examens biologiques et des imageries cérébrales ; les premiers pour exclure d'autres causes possibles des altérations cognitives observées (complication iatrogène, trouble psychiatrique, maladie infectieuse ou métabolique, *etc.*) et les seconds afin de déceler d'autres anomalies associées ou causales (accident vasculaire, hydrocéphalie, *etc.*), ainsi que des atrophies cérébrales caractéristiques.

La réalisation d'imageries cérébrales comme l'acquisition d'images IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et TEP (Tomographie par Émission de Positons) permettent de révéler dans le cas d'une maladie d'Alzheimer, une atrophie du lobe temporal interne de l'hippocampe corrélable au déficit cognitif (Scheltens *et al.*, 1992 ; Laakso *et al.*, 1998), et une diminution du métabolisme du glucose et du débit sanguin cérébral au niveau pariéto-temporal et cingulaire postérieur (Mosconi *et al.*, 2008 ; Marchitelli *et al.*, 2018) ;

Les formes précoces de la maladie d'Alzheimer posent davantage de problèmes dans l'établissement du diagnostic de la maladie, puisque les patients sont souvent considérés à tort comme relevant de la psychiatrie.

Dans ces cas atypiques de suspicion de maladie d'Alzheimer, d'autres examens peuvent être indiqués comme une analyse du liquide cérébro-spinal (LCS) avec dosage des protéines « Tubulin Associated Unit » (tau) totales, tau phosphorylées et A β -42.

Dans ce genre de cas, la réalisation d'une étude génétique peut être intéressante afin d'identifier la mutation des trois gènes causaux actuellement identifiés (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*). Après consentement écrit, cette analyse peut être réalisée chez les patients ayant des antécédents familiaux de démence évocateurs d'une transmission autosomique dominante, ainsi que chez les apparentés (Lanoiselée *et al.*, 2017).

Dans cette phase de diagnostic, c'est le médecin généraliste qui est en premier sollicité. Dans le cas de troubles cognitifs avérés, le patient doit être réorienté vers des médecins spécialistes de la mémoire et dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Cette complexité dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer a longtemps posé problème, notamment dans le recrutement de patient pour la réalisation des essais cliniques. Notamment, un des symptômes de la maladie d'Alzheimer, l'agnosie (dénier des troubles de la maladie), peut apparaître relativement précocement. Elle constitue un mécanisme de défense psychologique qui rend l'examen et l'évaluation des fonctions cognitives peu représentatifs des réels troubles du patient, alors que l'entretien neuro-psychologique est l'examen de première ligne dans le diagnostic de la maladie (Dubois, 2009).

De plus, la maladie d'Alzheimer est une maladie de la personne âgée, et son diagnostic se pose souvent avec un tableau clinique déjà riche. Cette comorbidité complexifie évidemment le diagnostic, surtout lorsque des altérations de la sphère perceptive sont à déplorer comme les troubles de l'audition ou des troubles visuels qui rendent impraticables les tests cognitifs.

Le seul diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer est obtenu par autopsie du cerveau *post mortem* et par la visualisation en analyse histologique des deux lésions caractéristiques de la maladie : les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (Weller et Budson, 2018).

Malgré tout, les défis technologiques et expérimentaux relevés par la recherche neuroscientifique ont permis de faire émerger, lorsqu'ils sont associés à des troubles dans les évaluations cognitives, de nouveaux critères diagnostiques précoces comme la visualisation de lésions de morphologies particulières en IRM et en TEP, ainsi que le titrage amyloïde et tau du LCS (cf. Première partie : 3.1. Ce que nous a appris l'exploration non invasive du cerveau).

L'association de l'ensemble de ces critères peut dorénavant être considérée comme un diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer réalisable du vivant du patient, mais l'obtention de

ces résultats résulte d'une batterie d'examen qui ne sont pour l'heure réservés qu'à l'inclusion des patients dans des protocoles cliniques, ou pour les formes d'Alzheimer atypiques (Dubois, 2009).

1.2. La maladie d'Alzheimer à l'échelle cellulaire et moléculaire

1.2.1. Physiopathologie de la maladie

La perte progressive et irréversible des fonctions mentales observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer constitue la manifestation symptomatologique d'une neurodégénérescence du parenchyme cérébral se caractérisant par l'agrégation de protéines anormales conduisant à la mort progressive des neurones.

Deux types de lésions conduisent à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer :

- **L'accumulation de peptides amyloïde β ($A\beta$)** sous la forme de plaques et d'oligomères, dans le milieu extracellulaire et intracellulaire ;
- La **dégénérescence neurofibrillaire** des neurones qui correspond à l'accumulation dans le cytoplasme des neurones de structures filamenteuses constituées de protéines tau hyperphosphorylées.

La protéine tau (pour « tubuline associated unit ») est une protéine interagissant et favorisant l'assemblage et la stabilité des microtubules par phosphorylation. Son hyperphosphorylation anormale conduit à une diminution de son affinité pour les microtubules, entraînant une désorganisation du cytosquelette et son auto-assemblage avec d'autres protéines tau sous la forme de PHF (« Paired Helical Filaments » ou filaments appariés en hélice). Cette réorganisation est à l'origine d'une dégénérescence des neurones (Mandelkow *et al.*, 2007 ; Iqbal *et al.*, 2016).

Ces deux types de lésions sont spécifiques et caractérisent la maladie d'Alzheimer, bien qu'elles puissent également être retrouvées, de façon moins importante, au cours du vieillissement normal d'un individu.

Ces lésions sont précoces et sont observées bien avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie (environ une vingtaine d'années avant l'apparition des premiers symptômes) (Querfurth et LaFerla, 2010).

1.2.2. Étiologie des lésions A β

L'unité constitutive des plaques amyloïdes est le peptide A β , un peptide de 4-6 kDa de 40 à 42 acides aminés issu du clivage de la protéine APP (« Amyloid Peptide Precursor »).

Le gène codant l'APP est localisé chez l'homme sur le chromosome 21, et son expression donne naissance, grâce à un épissage alternatif, à trois isoformes majeures (APP₆₉₅, APP₇₅₁, et APP₇₇₀). L'APP est exprimée dans le cœur, les reins, les poumons, la rate, les intestins, et le cerveau (Ludewig et Korte, 2017).

L'APP₆₉₅ est l'isoforme prédominante dans les neurones tandis que les APP₇₅₁ et APP₇₇₀ se trouvent davantage dans les autres types cellulaires. C'est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à une grande famille de gènes regroupant également des gènes homologues codant pour des protéines analogues de l'APP : les APLP 1 et 2 (pour APP Like Protein).

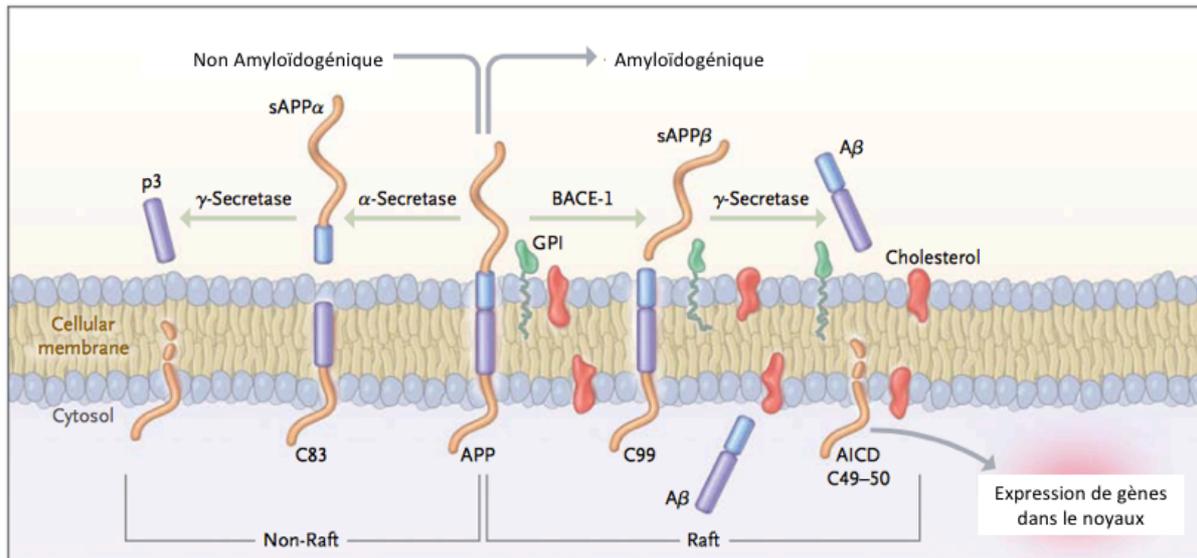
Le rôle physiologique de l'APP, de ses produits de clivage, et des protéines analogues APLP 1 et 2 n'est toujours pas complètement clarifié. Cependant, il a été montré que l'APP et ses fragments sont impliqués dans la régulation de la force synaptique. En effet, la famille APP est impliquée dans l'adhérence synaptique et participe ainsi à la construction et au support des contacts synaptiques. Elle a également un rôle important dans la plasticité synaptique, et au niveau présynaptique elle intervient dans la maturation et le développement du système nerveux central (SNC), ainsi que dans la machinerie de libération des vésicules présynaptiques. Au niveau postsynaptique, elle aurait un rôle dans la régulation de l'expression à la surface cellulaire des récepteurs NMDA (Müller et Deller, 2017 ; Ludewig et Korte, 2017).

Deux voies de clivage de la protéine APP peuvent être empruntées (Figure 2) :

- La voie non-amyloïdogénique qui fait intervenir l' α - et la γ -sécrétase. Dans ce cas, l' α -sécrétase clive l'APP dans le domaine A β , rendant impossible la libération du peptide A β . Un deuxième clivage par la γ -sécrétase libère ensuite les fragments APP α , P3 et AICD (pour « APP intracellular domain ») ;
- La voie amyloïdogénique qui fait intervenir la β - et la γ -sécrétases. Cette dernière voie est à l'origine de la libération du peptide A β . La libération du peptide A β nécessite un premier clivage par la β -sécrétase (une aspartyl protéase, aussi dénommée BACE-1 pour « beta-site APP cleaving enzyme 1 ») libérant le segment N-ter du peptide A β , et le fragment APP β .

Le segment C-ter du peptide A β est ensuite libéré par la γ -sécrétase, générant ainsi le peptide A β . Le complexe γ -sécrétase est peu précis, et bien que la majorité des peptides A β libérés soient clivés à l'acide aminé 40 (libérant le peptide A β -40), une petite partie des A β libérés sont clivés à l'acide aminé 42, libérant le peptide A β -42.

Figure 2 : Clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde « APP » et génération des peptides A β . D'après Eehalt *et al.*, 2003 ; Querfurth et LaFerla, 2010.



En conditions physiologiques, la voie non-amyloïdogénique est la voie de clivage principalement empruntée, et la raison pour laquelle une voie est privilégiée par rapport à l'autre est toujours mal comprise. L'hypothèse la plus retenue est celle selon laquelle une accumulation de l'APP au sein de radeaux lipidiques orienterait le clivage de l'APP vers la voie amyloïdogénique, conduisant à la libération des peptides A β , (Eehalt *et al.*, 2003 ; Querfurth et LaFerla, 2010).

1.2.3. Étiologie des lésions tau

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est une lésion que l'on retrouve associée aux dépôts d'amyloïde sur les analyses histologiques réalisées sur les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer. Elle correspond à l'accumulation dans le cytoplasme des neurones de structures filamenteuses appelées PHF.

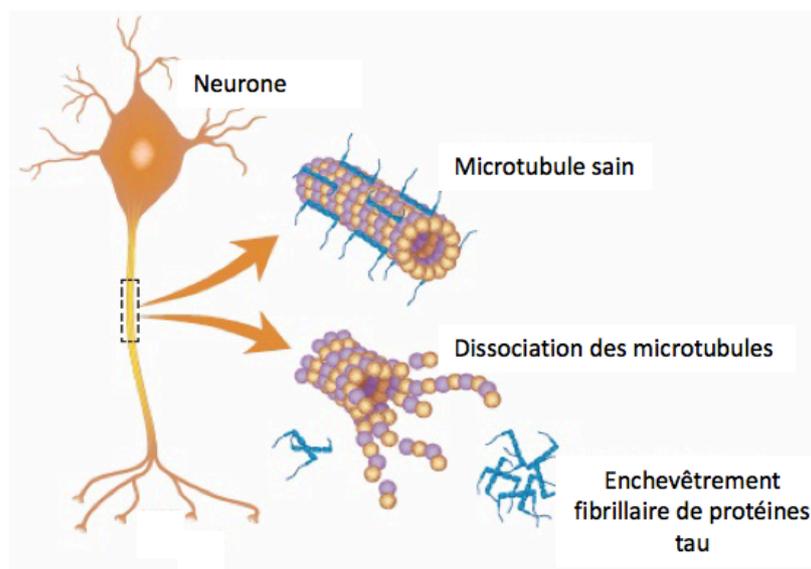
Bien que la DNF se retrouve systématiquement, elle n'est pas spécifique de la maladie d'Alzheimer, et elle se retrouve dans d'autres types de démences que l'on peut regrouper sous le terme

de « tauopathies » et qui comprennent : les démences fronto-temporales, certains syndromes parkinsoniens, la maladie de Pick, *etc.* (Polanco *et al.*, 2017).

Le terme « tauopathie » provient de la protéine tau, qui a été identifiée, pour la première fois par Brion en 1985, comme le composant majoritaire de ces PHF.

La protéine tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAP pour « Microtubule Associated Protein »). Elle assure la stabilisation et la polymérisation des microtubules en promouvant l'assemblage des tubulines (Figure 3). En plus de sa fonction au niveau du cytosquelette neuronal, la protéine tau est également impliquée dans la neurotransmission (Iqbal *et al.*, 2016).

Figure 3 : Rôle et altération fonctionnelle de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer. D'après « Alzheimer's Disease ».



La protéine tau est codée par le gène *MAPT* situé sur le bras long du chromosome 17, locus 21. La protéine tau possède six isoformes résultant d'un épissage alternatif de son ARNm, de 441, 410, 412, 381, 383 et 352 acides aminés (Goedert *et al.*, 1989).

Ces six isoformes diffèrent par la présence de zéro à deux inserts d'une séquence de 29 acides aminés dans leur région N-terminale, ainsi que par la présence de trois à quatre domaines répétés de liaison aux microtubules à leur extrémité C-terminale (Goedert *et al.*, 1989).

Des études biochimiques de la protéine tau ont permis de mettre en évidence que la protéine tau présente au sein des PHF, mais également au sein des oligomères de tau est anormalement phosphorylée dans le cerveau en cas de maladie d'Alzheimer. En effet, plus de 40 sites

d'hyperphosphorylation anormale ont été identifiés dans ces agrégats et structures fibrillaires. Cet état de phosphorylation anormale perturbe la fonction physiologique de tau et est à l'origine de son oligomérisation et de son assemblage en PHF, aboutissant *in fine* à la dégénérescence des neurones (Iqbal *et al.*, 2016).

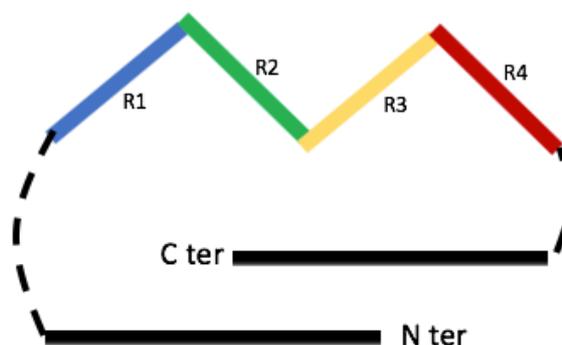
Deux mécanismes peuvent expliquer l'état anormalement phosphorylé de la protéine tau :

- Un mauvais équilibre entre les activités des kinases et phosphatases de la protéine tau, à l'origine d'une hyperphosphorylation de tau,
- La génération d'une grande quantité de tau libres, et non associée aux microtubules, qui sont davantage susceptibles d'être anormalement phosphorylés. Ce pool de tau libres est principalement dû à des mutations faisant varier le nombre d'inserts N-ter et C-ter, à l'origine d'une diminution de son affinité pour les microtubules (Iqbal *et al.*, 2016).

La protéine tau normale dispose d'une structure en épingle dont les extrémités N-ter et C-ter se replient au niveau des domaines de liaison aux microtubules, ce qui stimule l'assemblage et la stabilisation des microtubules (Figure 4). Lorsque tau est anormalement phosphorylée, son affinité diminue et elle se trouve dissociée des microtubules. Ses domaines de liaison sont alors exposés, autorisant ainsi l'auto-assemblage des protéines tau en oligomères et en PHF (Mandelkow *et al.*, 2007). L'agrégation des protéines tau est pour finir à l'origine de son oligomérisation et de son assemblage en PHF.

Figure 4 : Représentation schématique de la conformation en épingle de la protéine tau. D'après Mandelkow et al., 2007.

R1, R2, R3 et R4 correspondent aux domaines répétés de liaison aux microtubules.



Expérimentalement, seule la toxicité des oligomères de tau hyperphosphorylées a été démontrée (Lasagna-Reeves *et al.*, 2011). Les PHF serait en fait une réponse neuroprotectrice du neurone permettant la séquestration des oligomères cytotoxiques (Iqbal *et al.*, 1994 ; Morsch *et al.*, 1999).

Si le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer contient des protéines tau anormalement phosphorylées contrairement au cerveau sain, les deux possèdent la même quantité de protéine tau normale. Malheureusement, cet ensemble de protéines tau normales est rapidement altéré : à la manière d'un mécanisme de type « prion », la protéine tau anormalement phosphorylée est capable de se lier à la protéine tau normale et de la modifier, ce qui est à l'origine d'une propagation des formes hyperphosphorylées (Iqbal *et al.*, 2016).

Les protéines tau hyperphosphorylées sont également capables de séquestrer d'autres protéines associées aux microtubules comme la MAP1 et la MAP2, amplifiant ainsi le désassemblage des microtubules, et la perturbation du transport axonal le long du cytosquelette neuronal. La compromission du transport axonal conduit finalement à la dégénérescence rétrograde des neurones et à la perte synaptique puis à la mort neuronale responsable de la démence décrite dans la maladie d'Alzheimer (Iqbal *et al.*, 2016).

1.3. Théorie de la cascade amyloïde et formation des plaques amyloïdes

Du fait de ses deux acides aminés supplémentaires, le peptide A β 42 (A β -42) est davantage hydrophobe et s'agrège plus rapidement que le peptide A β -40. Il est également le peptide amyloïde retrouvé en plus grande quantité chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et est tenu pour responsable des symptômes observés (Querfurth et LaFerla, 2010).

En effet, l'accumulation et l'agrégation des peptides A β -42 est à l'origine de la formation de fibrilles insolubles et neurotoxiques responsables de la formation des plaques amyloïdes.

Les observations menées en microscopie électronique à balayage (MEB) suggèrent que les peptides A β -42 s'accumulent et s'agrègent dans les endosomes et leurs vésicules et organelles associées au niveau des axones et des dendrites, à la fois au sein des compartiments pré- et postsynaptiques.

En s'accumulant, les peptides A β -42 peuvent de plus s'associer et former des oligomères solubles et insolubles. Finalement, les données menées en MEB laissent penser que les plaques amyloïdes seraient ensuite générées par les vestiges de ces neurites dégénérés, ce qui permettrait de faire le lien entre

l'accumulation des peptides A β , le dysfonctionnement synaptique précoce, et la genèse des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer.

Néanmoins, au niveau moléculaire, le mécanisme expliquant la neurotoxicité des peptides A β reste toujours inconnu (McGowan *et al.*, 2005 ; Gouras *et al.*, 2005 ; Takahashi *et al.*, 2017).

À la formation de ces plaques amyloïdes, s'ajoute une autre lésion neuropathologique bien connue dans la maladie d'Alzheimer : la dégénérescence neurofibrillaire. Les protéines tau hyperphosphorylées se retrouvent notamment autour des plaques amyloïdes, et la chronologie d'apparition des affections tau et amyloïde l'une par rapport à l'autre, ainsi que leur influence l'une sur l'autre est encore sujet de débat. Alors que les lésions tau semblent précéder les lésions amyloïdes, l'implication des dépôts amyloïdes dans la symptomatologie de la maladie d'Alzheimer est encore discutée (Iqbal *et al.*, 2016).

L'ensemble des études des gènes impliqués dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer supporte la théorie de la cascade amyloïde de Hardy selon laquelle l'accumulation d'A β précéderait celle de tau, et la déclencherait.

En effet, la plupart des mutations du gène *APP* humain sont pathogènes et sont à l'origine de maladies d'Alzheimer précoces dite familiales. Toutes les mutations dominantes conduisant à l'apparition d'une maladie d'Alzheimer précoce ont lieu soit au niveau du substrat, c'est-à-dire la protéine précurseur de l'amyloïde APP, soit au niveau de la protéase (Présenilline) de la réaction générant le peptide A β . Ces mutations sont à l'origine d'une libération excessive du peptide A β -42 par rapport au peptide A β -40 suggérant le rôle critique du peptide A β -42 dans la genèse de la maladie d'Alzheimer (Cole et Vassar, 2007).

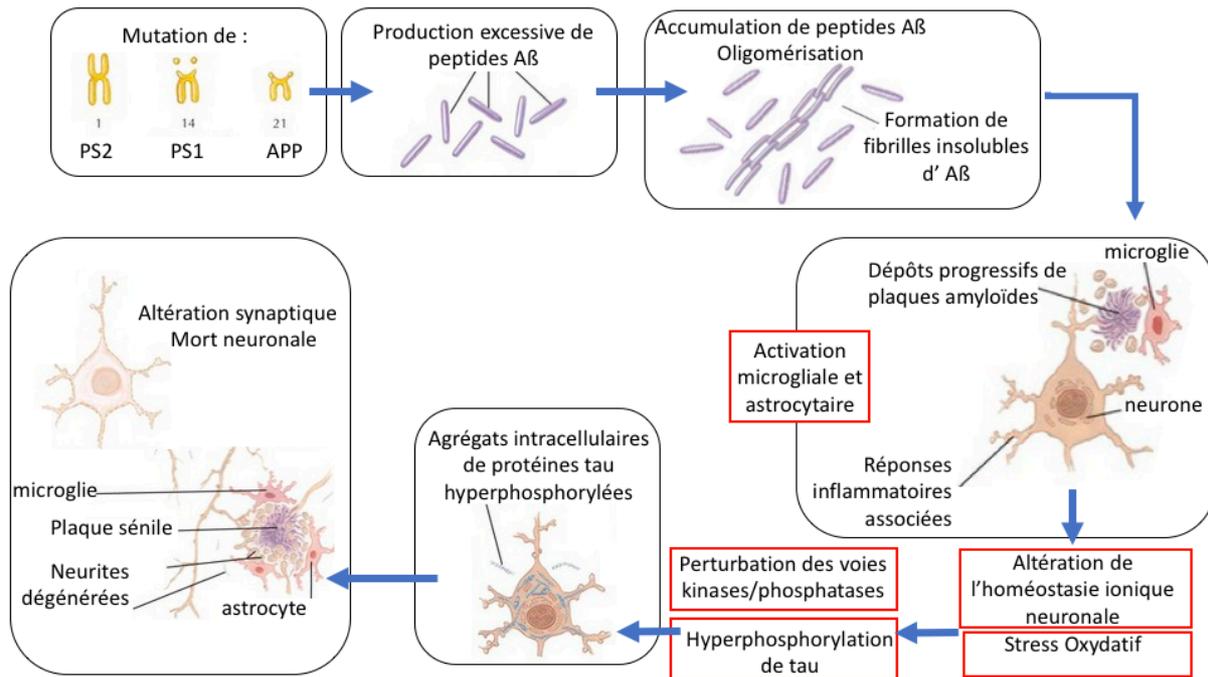
De plus, la triplication du gène *APP*, situé sur le chromosome 21, qui a lieu dans le syndrome de Down, est à l'origine d'une prédisposition des sujets atteints de trisomie 21 à développer une maladie d'Alzheimer.

Finalement l'ensemble de ces données mène la communauté scientifique à approuver cette théorie, ou du moins à l'explorer.

Selon ce schéma proposé par Hardy (Figure 5), l'oligomérisation des peptides A β et la formation de plaques amyloïdes seraient à l'origine d'une activation astrocytaire et microgliale déclenchant une neuro-inflammation. Les réponses inflammatoires enclenchées altèreraient l'homéostasie ionique neuronale et produiraient un stress oxydatif perturbant les activités des kinases et phosphatases conduisant à l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau et à la dégénérescence neurofibrillaire (Selkoe et Hardy, 2016).

In fine, l'apparition de ces deux lésions serait à l'origine d'un dysfonctionnement général des neurones et des synapses, conduisant à la mort neuronale et aux déficits cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer (Weiner et Frenkel, 2006 ; Cole et Vassar, 2007).

Figure 5 : Les évènements successifs de la théorie de la cascade amyloïde selon Hardy. D'après Selkoe et Hardy, 2016.



Cependant, certains défis mettent à mal l'hypothèse de la cascade amyloïdogénique. En effet, l'accumulation des plaques Aβ dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est mal corrélée avec les déficits cognitifs observés, et la présence asymptotologique de plaques Aβ dans le cerveau d'individus sains pose question. En outre, les essais immunothérapeutiques de réduction de la charge amyloïde conduisent effectivement à une meilleure clairance amyloïde, sans toutefois être à l'origine d'une restauration des performances cognitives des patients (Selkoe et Hardy, 2016 ; Coronel *et al.*, 2018).

2. Épidémiologie

2.1. Étude Paquid (Personne âgée quid)

La maladie d'Alzheimer se caractérise par des déficits mnésiques progressifs et par des atteintes cognitives s'accompagnant d'une altération de la personnalité.

Plus de 24 millions de personnes dans le monde en sont affectées, faisant de la maladie d'Alzheimer la cause la plus courante de démence, alors même qu'aucun traitement pouvant guérir la maladie n'existe à ce jour (Mayeux et Stern, 2012).

L'étude Paquid (Personne âgée quid) est la principale source de données épidémiologiques sur les démences en France. L'étude Paquid comprend une cohorte populationnelle de sujets français de Dordogne et de Gironde âgés de plus de 65 ans. Cette étude a permis depuis 1988 l'étude du vieillissement cognitif et fonctionnel d'un échantillon représentatif de la population française de plus de 65 ans dans le but de recueillir davantage d'informations sur l'épidémiologie de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées (Dartigues *et al.*, 2012).

Sur les 3777 sujets, cette étude a permis de recueillir les premières estimations françaises sur la prévalence, l'incidence et la durée moyenne de la maladie d'Alzheimer, et d'en ressortir les facteurs de risque, ainsi que les facteurs protecteurs.

En 1993, une première prévalence de la maladie d'Alzheimer a été estimée sur 3149 sujets de la cohorte Paquid : 4,3 % des sujets de plus de 65 ans étaient atteints de démence contre 7,7 % chez les sujets de plus de 75 ans (Letenneur *et al.*, 1993).

Sur les 3777 sujets initiaux, 1461 sujets (soit 37,8 %) ont été revus dix ans après leur inclusion dans la cohorte Paquid, afin d'établir une estimation plus récente de la prévalence de la maladie d'Alzheimer chez ces 1461 sujets de plus de 75 ans.

Ainsi la prévalence de démence a été estimée à 17,8 % des 1461 sujets de plus de 75 ans (Tableau 1). De ces démences, 79,6 % d'entre elles furent diagnostiquées comme maladie d'Alzheimer, et 10 % d'entre elles comme démences vasculaires (Helmer *et al.*, 2006).

Tableau 1 : Prévalence des démences en fonction de l'âge et du sexe sur 1461 sujets de plus de 75 ans de la cohorte Paquid. D'après Helmer et al., 2006.

Âge (années)	Hommes		Femmes		Total	
	Cas de démence (en nombre)	Prévalence	Cas de démence (en nombre)	Prévalence	Cas de démence (en nombre)	Prévalence
75-79 ans	20	7,7 %	20	5,7 %	40	6,5 %
80-84 ans	17	12,5 %	38	16,6 %	55	15,1 %
85-89 ans	24	22,9 %	64	29,9 %	88	27,6 %
90 ans et plus	10	27,0 %	67	52,8 %	77	47,0 %
Total	71	13,2 %	189	20,5 %	260	17,8 %

De ces données on peut retenir l'augmentation de la prévalence avec l'âge, ce qui reste largement concordant avec la littérature internationale, ainsi que l'augmentation notable de la prévalence chez les femmes (20,5 %) par rapport aux hommes (13,2 %). En effet, les femmes constituent la majorité des cas de démences (72,7 % des cas).

La prévalence des démences chez les femmes augmente de façon exponentielle après 90 ans d'âge et pourrait s'expliquer par l'espérance de vie plus importante de 8 ans chez les femmes par rapport aux hommes, en France.

Autre remarque notable, cette estimation de la prévalence des démences chez les plus de 75 ans est beaucoup plus importante que celle estimée dix ans plus tôt au sein de la même étude Paquid. Cette augmentation dans l'estimation peut refléter une augmentation de la prévalence réelle ou bien refléter les différences et les améliorations méthodologiques et diagnostiques qui ont eu lieu durant cet intervalle de 10 ans.

Malgré des améliorations méthodologiques, il est important de considérer que cette augmentation dans l'estimation de la prévalence des démences peut traduire une réelle augmentation de la prévalence dans la population française, du fait de l'augmentation de l'espérance de vie, de la diminution du taux de mortalité (en particulier grâce à l'amélioration de la gestion des maladies cardiovasculaires). Ceci constitue *in fine* une sélection de sujets âgés plus susceptibles de développer une démence (Helmer et al., 2006).

Le suivi longitudinal des patients de la cohorte Paquid a également permis de décrire l'évolution détaillée des démences et de la maladie d'Alzheimer plusieurs décennies avant

l'établissement du diagnostic de démence, et de mieux connaître le stade prodromal de la maladie d'Alzheimer.

Grâce à l'étude Paquid, des nombreux facteurs de risque de démence et de la maladie d'Alzheimer ont été mis en évidence (Tableau 2).

Tableau 2 : Facteurs de risque et protecteurs identifiés chez les sujets de la cohorte Paquid. D'après Dartigues et al., 2012.

BMI : « Body Mass Index ». **HTA** : Hypertension artérielle. **HDL** : Cholestérol « High Density Lipoprotein ». **IgM** : Immunoglobulines M.

Majore le risque	Neutre	Minore le risque
Âge élevé		
Femme		Homme
ApoE 4	Démence dans la famille	
Niveau d'études primaire	Certificat d'études primaires	Niveau supérieur
	Profession	
	Âge de retraite	
		Activités sociales et loisirs
Célibataire	Divorcé, veuf	Marié
		Bonnes relations avec l'entourage
Tabac		Consommation modérée de vin
		↗ Flavonoïdes
		Consommation de poisson (1x/sem)
Benzodiazépines	Anti-inflammatoires	
BMI < 21	Diabète	
Symptômes dépressifs	HTA	
	Traumatisme crânien	
↘ Vitamine E plasmatique		↗ HDL cholestérol
↗ IgM Herpes		
↗ Exposition aux pesticides		
↗ Aluminium dans l'eau		↗ Silice dans l'eau

Certains de ces facteurs sont en concordance avec la littérature, comme le sexe, l'âge, le niveau d'études et la consommation de vin et de tabac. En ce qui concerne les facteurs psychosociaux (activités sociales, loisirs, entourage familial, dépression, etc.), ils sont plus controversés, dans la mesure où il est difficile de savoir s'ils sont une cause ou une conséquence de la démence.

Des facteurs protecteurs ont pu être dégagés (consommation de poisson, flavonoïdes) et présentent un certain intérêt dans la mesure où aucun traitement étiologique n'est efficace à ce jour et qu'ils offrent de potentielles perspectives préventives, (Dartigues *et al.*, 2012).

En ce qui concerne le devenir des sujets déments, l'étude Paquid a montré qu'au terme des huit premières années de suivi, la durée moyenne de survie était de 4,5 ans à partir du diagnostic de démence, ceci avec une survie plus longue pour les femmes atteintes de démence que les hommes atteints de démence (Helmer *et al.*, 2006 ; Berr *et al.*, 2007 ; Dartigues *et al.*, 2012).

L'âge étant le premier facteur de démence et de maladie d'Alzheimer, la fréquence plus grande de démence chez les femmes peut être liée à la durée plus longue de la maladie, du fait de l'espérance de vie plus importante chez les femmes par rapport aux hommes, mais peut également être liée au niveau d'éducation plus faible des femmes issues de cette génération. Ainsi l'association entre les démences et le sexe du sujet donne encore lieu à controverse selon les études.

En ce qui concerne l'étude française, l'incidence des démences n'était plus élevée chez les femmes de la cohorte Paquid qu'à partir de 80 ans d'âge.

L'étude Paquid tend également à démontrer que durant les trois dernières années précédant la démence, le déclin des scores aux tests neuropsychologiques s'accélère, ce qui pourrait constituer un indice prémonitoire de la démence et rentre ainsi en contradiction avec les données actuelles plaçant l'apparition des troubles cognitifs tardivement, voire des dizaines d'années après la détection des biomarqueurs de l'amyloïde, ou des atrophies hippocampiques détectables à l'IRM (Alpérovitch *et al.*, 2002 ; Helmer *et al.*, 2006).

2.2. Étude des 3C (Trois Cités)

L'étude des Trois Cités, plus ambitieuse que l'étude Paquid, a pris la suite de celle-ci et des résultats obtenus. Elle a notamment pour but de décortiquer ces derniers résultats en conjuguant le suivi populationnel à la mesure des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer et à la réalisation d'imageries cérébrales afin de connaître la séquence précise d'apparition de ces événements dans la maladie d'Alzheimer (Alpérovitch *et al.*, 2002).

Bien que l'augmentation de l'incidence des démences et de la maladie d'Alzheimer puisse être en partie expliquée par une sensibilisation plus grande à la fois du personnel médical et de l'entourage

des personnes rentrant dans le grand âge, le départ massif des baby-boomers à la retraite entre 2012 et 2022 représente un problème de santé publique majeur pour les 20 prochaines années.

La validation de facteurs de risque réels modifiables ainsi que de facteurs protecteurs des démences et de la maladie d'Alzheimer est un enjeu considérable. Ainsi l'enjeu de l'étude 3C, par le suivi de plus de 9500 sujets âgés de plus de 65 ans, est la mise en place, dans un futur proche, de stratégies de prévention de la démence, permettant d'en diminuer l'incidence et le fardeau, individuel et social.

Une étude menée sur la cohorte des Trois Cités a récemment apporté quelques éléments de réponses à ces questions (Ritchie *et al.*, 2010). Cette étude a permis de hiérarchiser cinq facteurs de risque et de protection (intelligence cristallisée, consommation de fruits et légumes, diabète, mutation de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoprotéine E) en modélisant l'impact d'une suppression spécifique de tel ou tel facteur sur l'incidence des démences.

Il a ainsi été montré que la combinaison d'un niveau plus élevé d'intelligence cristallisée (correspondant à l'habilité à exploiter nos expériences et nos connaissances acquises, par opposition à l'intelligence fluide correspondant à l'habilité de réflexion et de raisonnement), de consommation de fruits et légumes, ainsi que l'élimination de la dépression et du diabète était la combinaison ayant le plus d'impact sur la réduction de l'incidence des démences.

Bien que cette modélisation nous permette de donner les facteurs prioritaires de prévention et d'intervention, il faut souligner que ces résultats sont à examiner avec précaution puisque le calcul du risque attribuable (c'est-à-dire la proportion des cas de démence que l'on peut attribuer aux facteurs de risque), ainsi que du « hazard ratio » obtenu par le modèle Cox est défini par des niveaux d'exposition définis arbitrairement (comme la durée des symptômes, ou le seuil de certains paramètres biologiques).

3. La maladie d'Alzheimer : un défi expérimental et technologique pour les neurosciences

Comprendre et traiter les maladies du système nerveux central se révèle être un enjeu majeur pour notre ère. En particulier, les maladies neurodégénératives représentent un lourd coût sociétal et économique.

Mais le système nerveux central reste l'objet de tous les défis, incompréhensions et prouesses scientifiques.

Pour donner un sens à ce système complexe, plusieurs défis ont déjà été relevés. Il est dorénavant possible d'observer, mesurer le cerveau vivant « penser » à travers la boîte crânienne grâce aux progrès fulgurants de l'imagerie cérébrale. L'apport de l'expérimentation animale, ainsi que l'élaboration de bons modèles animaux ont également permis de modéliser les principaux mécanismes des affections neurodégénératives humaines.

Le défi subsistant reste conceptuel : il nous faut encore comprendre le système nerveux et ses affections dans leur globalité, ainsi que leur hétérogénéité et leur variabilité. Comprendre comment plus de 100 milliards de cellules nerveuses communiquent entre elles au niveau des 10^{15} synapses qui composent le cerveau humain, comment et quel est le signal aboutissant à leur dégénérescence...

3.1. Ce que nous a appris l'exploration non invasive du cerveau

L'entrée dans le domaine médical de physiciens et mathématiciens a permis de faire émerger de nouvelles méthodes de détection et de représentation de l'activité et de l'anatomie cérébrales à travers la boîte crânienne. Parmi ces différentes techniques d'exploration, deux techniques de neuro-imagerie moderne ont permis de faire des avancées notables et d'explorer davantage les démences, et notamment la maladie d'Alzheimer : L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la Tomographie par Émission de Positons (TEP).

3.1.1. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

À ce jour, le seul diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer est réalisé *post mortem* par biopsie et histologie, et le diagnostic du vivant du malade reste encore complexe. Ainsi les techniques d'imagerie modernes ont été mises au service de la détection clinique de la maladie d'Alzheimer en proposant de nouveaux critères diagnostiques basés sur des biomarqueurs repérables en neuro-imagerie, (Trombella *et al.*, 2016).

La découverte du phénomène de résonance magnétique nucléaire et son utilisation pour la réalisation d'images anatomiques a permis d'obtenir pour la première fois des images du système nerveux central d'une très grande résolution anatomique. Sous l'effet d'un champ magnétique B_0 constant, une onde radio émise à la fréquence propre de l'hydrogène entraîne le basculement des spins des atomes d'hydrogène de l'eau composant la matière. Les spins basculent d'une position de basse énergie (position parallèle au champ magnétique constant) à une position de haute énergie (position antiparallèle), et se synchronisent. À l'arrêt de l'émission de l'onde radio, les spins des protons

retournent à leur équilibre initial, en restituant l'énergie accumulée pendant la synchronisation sous la forme d'une onde radiofréquence qu'une antenne située dans l'IRM peut capter et localiser grâce à gradient de champ magnétique. Le temps de retour des spins à leur orientation d'équilibre est appelé temps de relaxation. Cette phase de relaxation se décompose en deux phénomènes : la relaxation longitudinale T1 et la relaxation transversale T2. Chaque tissu possède une valeur T1 et une valeur T2 qui lui sont propres, ce qui permet d'interpréter le signal en un gradient de contraste entre les différentes zones cérébrales, et *in fine* de reconstruire les images anatomiques.

L'IRM s'est très vite imposée en neuro-imagerie en proposant des images cérébrales d'une très grande résolution anatomique grâce à la réalisation de plusieurs plans de coupe sans artefacts osseux. Elle s'est notamment imposée comme une technique clé dans le dépistage et le diagnostic différentiel des démences, par la détection d'anomalies anatomiques plus ou moins spécifiques. Son recours est systématique dans la suspicion de démence, et elle permet de rechercher des causes éventuellement curables, des tumeurs, des lésions vasculaires ou hématomes, des traumatismes crâniens ou des atrophies de localisation évocatrice (« Maladie d'Alzheimer et maladie apparentées : diagnostic et prise en charge. », 2011).

Dans le but d'améliorer la détection aux stades précoces et la prise en charge rapide des démences, la HAS recommande dorénavant la réalisation d'une IRM lors de la suspicion de démence. Ainsi, dans le contexte d'une atteinte des fonctions cognitives, la détection par IRM d'une atrophie frontale et/ou temporale permet d'orienter le diagnostic vers une démence fronto-temporale, tandis que la démence à corps de Lewy se caractérise par une relative préservation des structures lobaires mésio-temporales. Les démences vasculaires quant à elles, se caractérisent davantage par la présence de nombreuses petites lésions ischémiques lacunaires au niveau de la substance blanche des hémisphères cérébraux sur des séquences IRM Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) ou T2. Pour la maladie de Creutzfeld-Jakob, les séquences FLAIR révèlent des lésions très caractéristiques en hypersignal au niveau des ganglions de la base (Tableau 3), (« L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique », 2010).

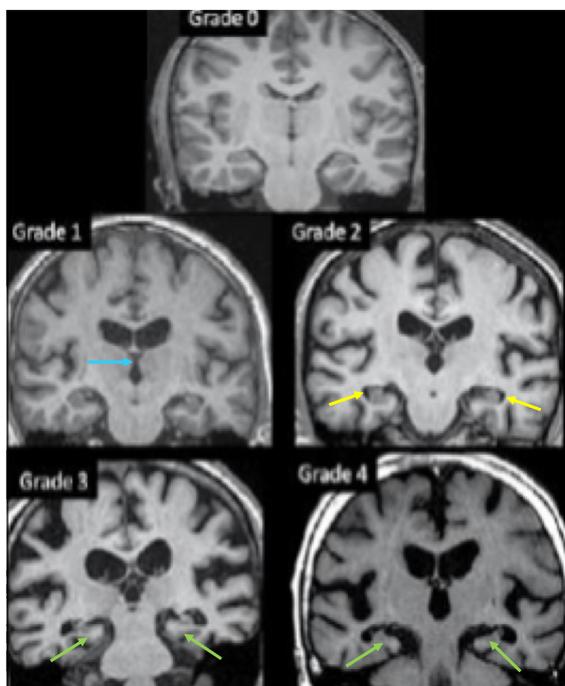
Tableau 3 : L'imagerie par Résonance Magnétique dans les critères de diagnostic des démences. D'après « L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique », 2010.

Affections	IRM	Critère
Démence vasculaire	Infarctus de localisation stratégique ou altérations extensives et lacunes multiples dans la matière blanche et les noyaux gris centraux	Critère majeur
Démence frontotemporale	Atrophie focale frontale et/ou temporale	Critère majeur
Démence à corps de Lewy	Pas d'atrophie du cortex méso-temporal par rapport à la malade d'Alzheimer	Pas un critère majeur
Maladie de Creutzfeld-Jakob	Hyperintensités en FLAIR sous-corticales ou corticales	Un des critères paracliniques pour un diagnostic de probabilité
Maladie d'Alzheimer	Atrophie méso-temporale	Un des critères paracliniques pour un diagnostic de probabilité

L'atrophie cérébrale étant l'une des conséquences de la neurodégénérescence, elle permet d'aiguiller vers un diagnostic de maladie d'Alzheimer. La réalisation de séquences T1, T2 et FLAIR en routine clinique permet de détecter et de mesurer une éventuelle atrophie temporale médiale (hippocampique), ainsi que de repérer des microsaignements pouvant témoigner d'une angiopathie amyloïde (Scheltens *et al.*, 1992 ; Scheltens *et al.*, 1994).

Cette atrophie temporale médiale se retrouve de façon marquée et précoce (jusqu'à trois ans avant le diagnostic de démence) dans la maladie d'Alzheimer et constitue un critère diagnostique lorsque celui-ci est associé à des troubles mnésiques. De plus, l'évaluation de la gravité de cette atrophie grâce à des échelles comme l'échelle de Scheltens (ou MTA-scale pour Medial Temporal lobe Atrophy scale) permet d'apprécier le pronostic du patient par l'évaluation de la taille de l'hippocampe, de l'élargissement de la corne temporale ventriculaire et de la fissure choroïdienne (Scheltens *et al.*, 1994), (Figure 6).

Figure 6 : Échelle de Scheltens. Reconstructions d'imagerie par résonance magnétique pondérées T1, coupes coronales. D'après « L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique », 2010. **Flèche bleue** : Fissure choroïdienne. **Flèches jaunes** : Corne temporale ventriculaire. **Flèches vertes** : Hippocampe.



Grade 0: Absence d'atrophie.

Grade 1: Atrophie possible ou douteuse, élargissement de la fissure choroïdienne.

Grade 2: Atrophie discrète, dilatation de la corne temporale ventriculaire.

Grade 3: Atrophie modérée, diminution modérée de la hauteur de la formation hippocampique.

Grade 4 : Atrophie sévère, diminution sévère de la hauteur de la formation hippocampique.

Bien que l'introduction des critères DSM-IV et NINDS-AIREN (« *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* » / Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences) ait facilité le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, en permettant d'exclure les autres types de démences, l'analyse volumique en IRM de structures clés permet de proposer aux cliniciens des critères objectifs de diagnostic de la maladie d'Alzheimer. De tels marqueurs sont essentiels pour la discrimination des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer dans les essais thérapeutiques et les études épidémiologiques. Cependant ces nouveaux critères IRM ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer, et peuvent se retrouver chez des patients âgés sains. Ils doivent impérativement être replacés dans le contexte de l'évaluation cognitive et clinique pour être informatifs (« Maladie d'Alzheimer et maladie apparentées : diagnostic et prise en charge. », 2011).

3.1.2. La Tomographie par Émission de Positons (TEP)

L'essor de l'imagerie nucléaire, et notamment la tomographie par émission de positons ainsi que de nombreux radiotraceurs ciblant le système nerveux central sont à l'origine de nombreuses

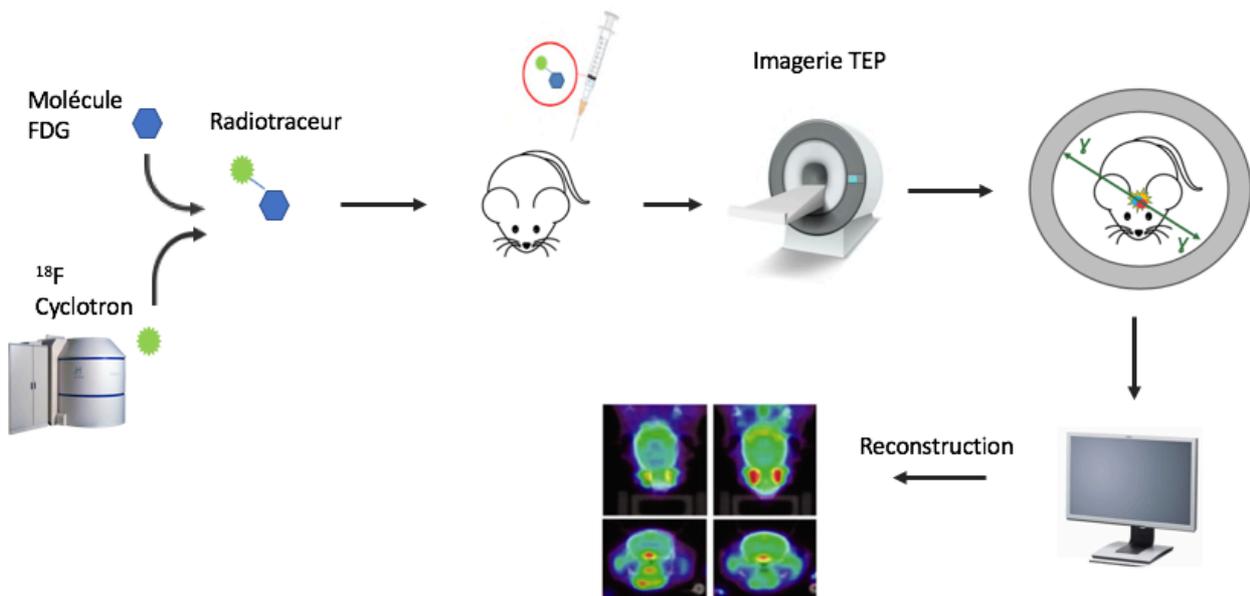
avancées dans le domaine de la neurologie. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet de décrire le décours temporel de la cible spécifique du radiotracer.

Le principe de la TEP repose sur le suivi d'un traceur spécifique d'une cible radiomarqué à l'aide d'un isotope radioactif, injecté par voie veineuse. Cet isotope radioactif est instable et retourne à son état de stabilité en émettant un positon (antiparticule de l'électron). En rencontrant un électron cédé par un atome du corps, les deux particules, positon et électron s'annihilent presque immédiatement. Cette annihilation se traduit par l'émission antiparallèle de deux photons γ . Une couronne de détecteurs permet de détecter la coïncidence de ces deux photons et de retrouver la localisation de l'annihilation grâce à des méthodes de calcul. La répétition des plans de coupe permet *in fine* de construire une image 3D de l'activité du radiotracer au cours du temps (Figure 7).

Étant donné la faible résolution spatiale des images TEP, la plupart des systèmes combinent TEP et imagerie anatomique (scanners X ou IRM) (Heurling *et al.*, 2017).

La TEP est le plus souvent utilisée pour le suivi du métabolisme énergétique à l'aide d'un radiotracer analogue du glucose marqué au fluor 18 (le 2-désoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose, ou [^{18}F]-FDG). Le suivi de ce radiotracer par imagerie TEP permet ainsi de décrire le métabolisme cérébral régional du glucose et donc l'activité cérébrale lors des tâches cognitives, en les cartographiant. C'est également un outil très utilisé pour le diagnostic et le suivi des tumeurs à haut métabolisme (Heurling *et al.*, 2017).

Figure 7 : Principe de la tomographie par émission de positons. D'après Heurling *et al.*, 2017.



À l'instar de l'IRM, l'imagerie TEP a permis de décrire les démences en localisant les différentes altérations fonctionnelles cérébrales, et de préciser le diagnostic étiologique des démences (maladie d'Alzheimer, démence fronto-temporale, démence vasculaire, démence à corps de Lewy, *etc.*). Ces anomalies fonctionnelles précèderaient les altérations anatomiques visibles en IRM, (Mosconi, 2005 ; Coleman, 2005).

Elle est un outil précieux dans le diagnostic des formes atypiques de la maladie d'Alzheimer (sans troubles mnésiques ou sans altérations anatomiques franches de la région hippocampique). En effet un hypométabolisme, d'abord unilatéral puis bilatéral, du cortex pariéto-temporal et cingulaire postérieur se retrouve fréquemment chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport au sujet sain. Au cours de la progression de la maladie d'Alzheimer, les lobes frontaux sont atteints plus tardivement. Les ganglions de la base, le thalamus, le cervelet, les cellules souches neurales adultes, ainsi que les cortex sensoriel et moteur ne présentent quant à eux pas d'hypométabolisme du glucose. Ces altérations énergétiques détectées en imagerie TEP restent en cohérence avec les troubles cliniques s'observant chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, et constituent des patterns caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

De la même façon, différents profils d'hypométabolisme du glucose ont pu être mis en évidence pour les autres causes de démence.

L'obtention par imagerie TEP et l'interprétation de ces profils d'anormalités dans le métabolisme du glucose constituent un test diagnostique de la maladie d'Alzheimer d'une sensibilité et d'une spécificité de 94 % et 73 %, respectivement (Coleman, 2005).

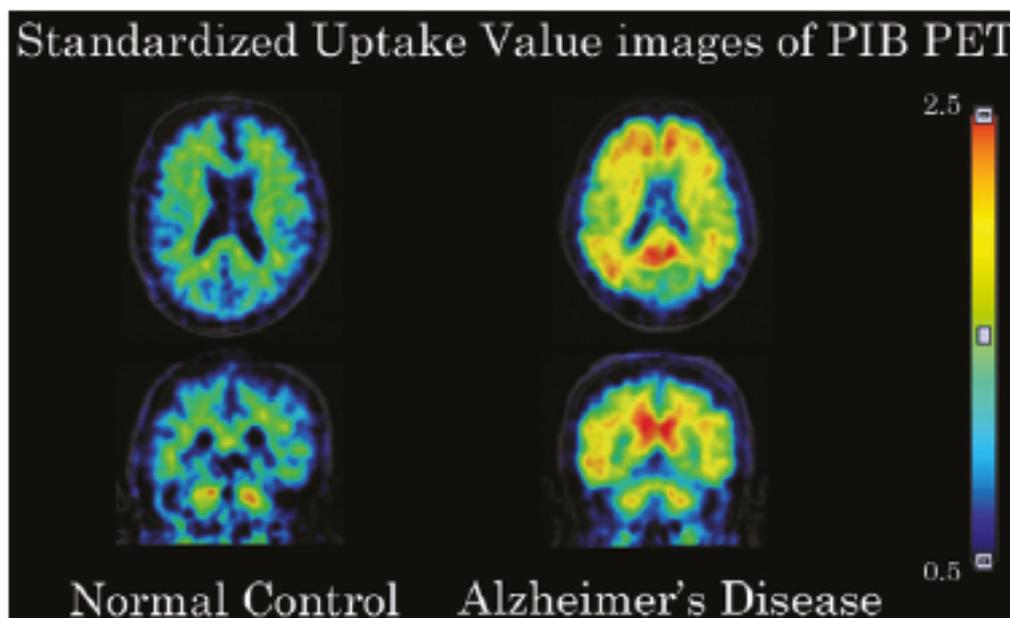
Outre le [¹⁸F]-FDG, de nombreux autres radiotraceurs sont utilisés pour la détection et le suivi de la maladie d'Alzheimer.

Les radiotraceurs ligands de l'acétylcholinestérase, ont notamment permis d'évaluer l'activité cholinergique cérébrale et de confirmer *in vivo* l'existence d'un déficit cholinergique précoce et dont l'intensité est corrélée avec les troubles cognitifs des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, (Mori *et al.*, 2012 ; Weiner *et al.*, 2013).

D'autres radiotraceurs ont révélé un intérêt majeur pour l'imagerie *in vivo* de l'amyloïde. Le plus connu, le [¹¹C]-PIB (« Pittsburgh Compound B »), permet de quantifier la charge amyloïde et de discriminer les patients atteints de la maladie d'Alzheimer précocement. Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent en effet une rétention forte du radioligand au niveau du néocortex (Figure 8) et les profils de fixation du [¹¹C]-PIB ont également pu montrer une forte corrélation avec l'immunohistochimie du peptide amyloïde (Mintun *et al.*, 2006 ; Bacskai *et al.*, 2007).

Figure 8 : Images obtenues par tomographie par émission de positons du peptide amyloïde. D'après Mori et al., 2012.

L'échelle de couleur représente les valeurs de fixation normalisées (SUV) du Pittsburgh Compound-B, (^{11}C)-PIB).



Outre l'inconvénient d'injecter un produit radioactif, l'imagerie TEP trouve ses limites dans la nécessité de disposer d'un cyclotron pour la synthèse du radioélément. Cela se révèle être d'autant plus contraignant pour les protocoles cliniques que les isotopes possèdent une période courte (pour le ^{11}C , le temps de demi-vie est de 20 minutes, celui du ^{18}F est de 110 minutes).

L'imagerie TEP- ^{18}F -FDG constitue un outil complémentaire au diagnostic de la maladie d'Alzheimer et des démences en général, lorsque les autres techniques d'évaluation n'ont pas été informatives. L'imagerie TEP- ^{11}C -PIB pour le suivi des plaques amyloïdes, et TEP- ^{18}F -DPA714 (*N*-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine-3-acetamide) pour le suivi de l'activation microgliale sont deux techniques encore peu utilisées en routine clinique mais dont l'intérêt est croissant dans l'étude de la pathogénie de la maladie d'Alzheimer et dans l'étude du suivi et de l'efficacité des essais thérapeutiques, ainsi que pour la discrimination et le classement des sujets participant à des essais cliniques, ou dans le domaine préclinique (Dubois, 2009 ; « Maladie d'Alzheimer et maladie apparentées : diagnostic et prise en charge. », 2011).

3.2. L'apport des modèles animaux dans la maladie d'Alzheimer

Le développement d'animaux modèles de la maladie d'Alzheimer se réalise parallèlement et étroitement avec l'amélioration des connaissances de la maladie. L'ensemble des observations pathologiques réalisées en clinique ou *post mortem* sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer permet de reproduire ces mêmes anomalies chez l'animal afin d'élaborer un modèle pertinent et fidèle à la maladie. Trois critères doivent être respectés pour obtenir un modèle animal représentatif de la maladie : la validité apparente (les anomalies cellulaires et cliniques doivent correspondre entre l'animal et l'homme), la validité de construction (les mécanismes pathogéniques sont les mêmes que dans la maladie humaine) et la validité prédictive (les conclusions tirées du modèle sont transposables à l'homme), (Denayer *et al.*, 2014).

En ce qui concerne la construction de ces animaux modèles de la maladie d'Alzheimer, ils sont pour la plupart transgéniques grâce à l'introduction dans le génome animal des gènes humains mutés, qui ont été identifiés dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Cette construction, bien que majoritaire ne satisfait pas pleinement les critères de validité de construction, étant donné que seulement 1 % des formes de maladie d'Alzheimer sont d'origine génétique.

Une importante part de la recherche en neurosciences porte sur la création et la caractérisation d'animaux modèles des maladies neurodégénératives, qui se révèlent indispensables pour l'étude et l'évaluation des fonctions supérieures et de leur dysfonctionnement.

La reproduction de l'amyloïdose et la tauopathie chez le modèle animal a été une étape clé dans la compréhension des mécanismes responsables des altérations fonctionnelles observées dans la maladie d'Alzheimer. Les modèles animaux ont ainsi rendu possible, en particulier en ce qui concerne la maladie d'Alzheimer, l'exploration des différentes hypothèses étiologiques, de décrire la pathogénie, et de valider au stade préclinique de nouvelles approches thérapeutiques (Götz *et al.*, 2018).

Depuis plusieurs décennies, les animaux modèles de la maladie d'Alzheimer, majoritairement des rongeurs, ont permis de faire des avancées scientifiques considérables, notamment en ce qui concerne l'implication fonctionnelle des protéines A β et tau sur les neurones, ce qui ne pouvait jusqu'alors pas être exploré du vivant des sujets atteints de la maladie d'Alzheimer.

L'origine de la toxicité des protéines tau et A β a toujours été sujet à controverse. La reproduction des lésions amyloïde et tau chez les rongeurs ont permis d'apporter des éléments de réponse en ce qui concerne leur lien plus ou moins direct avec la pathogénie et les signes cliniques de la maladie d'Alzheimer. La réalisation d'études biochimiques, génomiques, d'immunohistochimie et

des tests comportementaux a finalement permis d'apporter des nouveaux éléments de consensus sur la toxicité des formes oligomériques, et non plus des formes fibrillaires (Polanco *et al.*, 2017).

Cependant, l'implication spécifique d'une espèce particulière d'A β ou de tau par rapport à une autre n'est pas encore établie, ni quelle doit être la cible thérapeutique privilégiée (Götz *et al.*, 2018).

L'origine de la toxicité d'A β ou de tau a été en partie élucidée à l'aide des modèles animaux par l'identification de nombreuses modifications post-traductionnelles s'opérant sur ces deux protéines. En particulier, la cartographie des sites spécifiques d'hyperphosphorylation de la protéine tau, ainsi que l'essai de plusieurs inhibiteurs de kinases et des activateurs de protéases ont ouvert de nouvelles voies thérapeutiques.

Il est également apparu que la phosphorylation n'était pas la seule modification post-traductionnelle critique pour la toxicité de tau, et que les acétylations ainsi que des troncatures post-traductionnelles étaient également impliquées dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer (Tracy *et al.*, 2016 ; Ozcelik *et al.*, 2016). Notamment, la pyroglutamylation d'A β est à l'origine d'une neurodégénérescence qui est associée à des altérations des fonctions cognitives (Alexandru *et al.*, 2011).

Les arguments génétiques de la théorie de la cascade amyloïdogénique de Hardy ne satisfaisant pas entièrement la communauté scientifique, l'étude des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer a permis de se pencher sur l'interaction A β /protéine tau. Il a ainsi été permis de montrer que la protéine tau phosphorylée était relocalisée depuis la terminaison axonale vers le soma des neurones à la faveur d'une altération du segment initial axonal (Li *et al.*, 2011), alors même que cette altération fonctionnelle est médiée par les plaques A β (Marin *et al.*, 2016). Bien que le rôle pathologique de tau dans la toxicité des peptides A β ait été mis en évidence (Ittner *et al.*, 2010), une étude plus récente a permis d'identifier un site spécifique de phosphorylation T205 qui serait protecteur et diminuerait la toxicité des peptides A β au sein du modèle souris APP23 (Ittner *et al.*, 2016). De plus, il a dorénavant été montré que les oligomères d'A β étaient à l'origine d'une activation des voies de signalisation de kinases et d'une synthèse *de novo* de protéine tau, dont les résidus sérine, thréonine, tyrosine sont susceptibles d'être phosphorylés (Li et Götz, 2017). L'ensemble de ces données a permis de réorienter davantage les stratégies thérapeutiques vers une réduction de la concentration totale de protéine tau plutôt que de la protéine tau phosphorylée.

Enfin, le développement de ces méthodes expérimentales associées aux techniques de neuro-imagerie modernes a étoffé le modèle de dysfonctionnement synaptique dans la maladie d'Alzheimer

(en particulier cholinergique), en l'associant également à des aberrations dans les connexions et réseaux neuronaux (Palop *et al.*, 2006).

La grande partie des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer sont des modèles génétiquement modifiés ou expérimentaux. Malheureusement, ces modèles, pour la plupart rongeurs, ne permettent pas de reproduire toute la complexité des mécanismes moléculaires conduisant à l'apparition d'une maladie d'Alzheimer sporadique. Même si les modèles expérimentaux et transgéniques sont des modèles précieux pour décrire les conséquences des mutations ou de la surproduction des protéines impliquées dans la maladie, les modèles animaux naturels sont également d'un grand intérêt pour la confirmation des conclusions qui en sont tirées (Cummings *et al.*, 1996). Un modèle naturel intéressant pour l'étude de la maladie d'Alzheimer est le chien âgé atteint du syndrome de dysfonction cognitive. De par ses ressemblances cliniques et neuropathologiques avec les altérations qui s'opèrent chez le patient humain atteint de la maladie d'Alzheimer, le syndrome de dysfonction cognitive est considéré comme l'équivalent canin de la maladie d'Alzheimer. En plus de montrer une très grande motivation pour les récompenses alimentaires lors de la réalisation des tests cognitifs, le modèle canin, par son statut d'animal de compagnie, présente le même mode de vie, environnement et souvent la même alimentation que son maître et reflète ainsi la diversité et la complexité des multiples facteurs conduisant à une maladie d'Alzheimer sporadique (Schütt *et al.*, 2016). Le modèle canin présente de nombreuses altérations communes avec la maladie d'Alzheimer, comme des dépôts extracellulaires d'amyloïde, mais ne présente pas de tauopathie. Bien que la majorité des études portant sur le syndrome canin de dysfonctionnement cognitif aient permis de confirmer une corrélation positive entre la charge amyloïde et le déficit cognitif, d'autres méthodes de quantification de l'amyloïde n'ont pas montré d'association avec le déclin cognitif, suggérant que dans ce modèle naturel, et comme chez l'homme atteint de la maladie d'Alzheimer, l'affection amyloïde n'est pas seule responsable des altérations cognitives (Schütt *et al.*, 2016).

Bien que la compréhension de la maladie d'Alzheimer soit parcellaire, l'effort scientifique et les initiatives internationales comme le projet MODEL-AD du Jackson Laboratory ont, à l'aide d'une multitude de modèles animaux multiplié les données, générant un savoir considérable sur la maladie d'Alzheimer. La richesse et la variabilité des animaux modèles d'Alzheimer, qu'ils soient transgéniques ou non, peuvent être également source d'information. Les traitements de données de grande envergure sur l'ensemble des données acquises sur les différents modèles sont en plein essor et permettent de faire émerger de nouveaux profils de similitudes/anomalies dans les mécanismes

pathologiques de la maladie, en faisant ressortir les points critiques et potentiellement transposables à l'homme (Matarin *et al.*, 2015 ; Gaiteri *et al.*, 2016).

La maladie d'Alzheimer étant une maladie typiquement humaine, aucun modèle animal ne la reproduit parfaitement. Chaque modèle possède ses caractéristiques propres et répond à une question donnée du chercheur. Même si les anomalies cellulaires (amyloïdose et tauopathie) restent assez bien reproduites chez l'animal, ainsi que les altérations cognitives associées, le plus dur reste de reproduire correctement tous les aspects du vieillissement des patients atteints de la maladie d'Alzheimer sur des espèces animales dont l'espérance de vie est considérablement plus courte que la nôtre. Lorsque ces limitations sont prises en compte, les données inférées des modèles animaux sont exceptionnellement riches d'informations (Götz *et al.*, 2018).

4. État actuel des thérapies anti-Alzheimer

4.1. Traitements issus de l'hypothèse cholinergique

Plusieurs points de la genèse et de la progression de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore compris dans leur globalité. Les lésions s'opérant au cours de la maladie sont responsables d'une sévère neurodégénérescence des hippocampes et du cortex notamment, et conduisent à l'apparition des symptômes de démence (Masters *et al.*, 2015).

La découverte d'un déficit cholinergique majeur chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, conséquence d'une diminution de l'enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase, a permis l'élaboration de thérapies dites « de remplacement ». Cette découverte, en lien avec les rôles de l'acétylcholine dans l'apprentissage et la mémoire a permis de faire émerger « l'hypothèse cholinergique de la maladie d'Alzheimer », selon laquelle la dégénérescence des neurones du prosencéphale basal, riche de neurones cholinergiques, provoque une réduction de la neurotransmission cholinergique au niveau du cortex cérébral qui est à l'origine des troubles cognitifs et mnésiques observés dans la maladie d'Alzheimer (Francis *et al.*, 1999).

Les inhibiteurs de la cholinestérase, qui permettent d'antagoniser les effets amnésiants obtenus par des antagonistes des récepteurs cholinergiques, sont alors apparus comme de potentiels traitements pharmacologiques des altérations cognitives des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Parmi eux, le donépézil, la rivastigmine et la galantamine sont les plus utilisés. Ces traitements sont symptomatologiques et sont destinés principalement aux patients ayant reçu un diagnostic de maladie d'Alzheimer légère à modérée. L'étude de Birks a permis d'étudier l'efficacité de ces trois molécules sur la symptomatologie de la maladie d'Alzheimer par l'analyse de 13 essais cliniques d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Australie, sur une durée minimale de traitement de 6 mois (Birks, 2006). Ainsi, les individus atteints de la maladie d'Alzheimer traités par les inhibiteurs de cholinestérases ont révélé en moyenne une amélioration des fonctions cognitives avec un gain de 1,4 points sur l'échelle du MMSE de Folstein, comparativement aux individus ayant reçu un placebo. De plus, 7 % d'entre eux présentaient une amélioration de leur état clinique général. Cependant, 15 % des sujets traités par les inhibiteurs de la cholinestérase présentaient des effets secondaires de type vomissement/diarrhée, et 10 % des sujets traités ont interrompu le traitement en raison des effets secondaires mentionnés.

Cependant, lors de la Réévaluation du Service Médical Rendu par la HAS en octobre 2016, la HAS a donné son approbation quant au déremboursement de ces inhibiteurs de la cholinestérase, concluant que leur intérêt clinique était insuffisant, et que « ces médicaments n'avaient plus leur place dans le traitement de la maladie d'Alzheimer », compte tenu de :

- « l'absence de pertinence clinique des effets symptomatiques de ces médicaments,
- l'absence de démonstration d'efficacité sur les troubles du comportement, la qualité de vie, le délai d'entrée en institution, la mortalité, l'évolution de la maladie, la charge de la maladie sur les aidants,
- de leur profil de tolérance,
- du risque élevé d'interactions médicamenteuses chez les sujets âgés. » (« Synthèse d'avis de la Commission de la transparence, Haute Autorité de Santé », 2016)

4.2. Traitements issus de l'hypothèse amyloïdogénique

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'agrégation des peptides A β et dans leur toxicité constitue un enjeu majeur dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques modificatrices de la maladie (ou « disease modifying therapies ») (Aisen, 2009 ; Aleksis *et al.*, 2017). En effet, contrairement aux thérapies cholinergiques qui sont symptomatologiques et palliatives, la recherche moderne se concentre davantage sur le développement de stratégies thérapeutiques anti-Alzheimer centrées sur l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui attribue un rôle pathologique central aux peptides A β et à leur agrégation. De nombreuses approches thérapeutiques ont pu être développées

afin d'intervenir à différents niveaux de la cascade amyloïde. La grande majorité des thérapies anti-Alzheimer peuvent ainsi être regroupées en plusieurs stratégies thérapeutiques (Loera-Valencia *et al.*, 2018 ; Cappa, 2018).

- Celles visant à contrer les effets des gènes causaux de la maladie d'Alzheimer, comme l'ARN interférence anti-APP,
- Celles visant à intervenir sur les enzymes impliquées dans le clivage de l'APP et la génération des peptides A β , principalement des inhibiteurs des β - et γ -sécrétases, ou plus rarement des catalyseurs de l' α -sécrétase,
- Celles visant à favoriser la clairance amyloïde : c'est la stratégie thérapeutique majoritaire, par exemple par immunisation passive (anticorps monoclonaux anti-A β) ou active (vaccins anti-A β),
- Celles visant à juguler la neuro-inflammation,
- Celles qui promeuvent la neuroprotection,
- Ou encore les stratégies anti-tau.

Des échecs de grande ampleur en essais cliniques ont poussé le monde de la recherche à reconsidérer les cibles thérapeutiques visées auparavant, mais aussi les voies d'administration et les technologies employées. En effet, dans le cas des immunothérapies, même si les anticorps anti-A β arrivent à passer la BHE, seuls très peu d'entre eux y parviennent (entre 0,1 et 2 % de la dose effectivement injectée) (Miller et O'Callaghan, 2017).

Le développement de molécules thérapeutiques est dorénavant intégré dans un système multimodal tenant compte de l'interaction complexe entre neurones, astrocytes, cellules microgliales et cellules endothéliales vasculaires.

Cette réalité thérapeutique a amené à repenser les thérapies anti-Alzheimer actuelles, en motivant un nouvel axe de recherche thérapeutique : la modulation de la BHE.

Plus de 25 ans après la théorie de la cascade amyloïde de Hardy, la maladie d'Alzheimer n'est plus uniquement réduite à une affection A β , mais s'intègre dans un vaste ensemble de troubles multiples. Notamment, des altérations des réponses neuro-inflammatoires ont été identifiées comme des signes précoces de la maladie d'Alzheimer. La neuro-inflammation apparaît être précoce et inductrice des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, en effet, les individus exposés à des traitements anti-inflammatoires non stéroïdiens auraient moins de risques de développer la maladie d'Alzheimer (Balducci et Forloni, 2018).

**DEUXIÈME PARTIE : NEURO-
INFLAMMATION ET MALADIE
D'ALZHEIMER**

1. Caractéristiques générales de la neuro-inflammation

1.1. Le système nerveux central, un territoire immunologiquement privilégié

Le déclenchement d'une réponse immunitaire est indispensable dans l'élimination d'agents et de composants dangereux ou dégénérescents. Cette réponse inflammatoire favorise la régénération mais peut également causer des dommages tissulaires importants du parenchyme concerné.

Dans des territoires particulièrement vulnérables comme le système nerveux central, où les cellules fonctionnelles sont hautement différenciées, les structures se régèrent mal. De plus, les neurones sont difficilement remplaçables et ont un pouvoir de régénération faible.

Plutôt que le déclenchement d'une réponse neuro-inflammatoire conduisant à l'élimination de tous les neurones infectés, la modulation de la neuro-inflammation a été une stratégie évolutive efficace dans la tolérance de certains virus neurotropes, (Bechmann, 2005).

Ainsi, l'équilibre bénéfique/risque de la neuro-inflammation est hautement contrôlée pour préserver l'intégrité du parenchyme cérébral, faisant du système nerveux central un site tout à fait particulier vis-à-vis des réactions immunitaires. En 1953, Billingham et Boswell ont démontré l'incroyable tolérance immunitaire du système nerveux central par la mise en évidence de la tolérance de greffes de peau dans le cerveau de lapin, alors même que cette greffe était rejetée lorsqu'elle était pratiquée sur le tissu cutané. Ils ont alors proposé le terme de territoire « immunologiquement privilégié » pour qualifier le statut immunitaire particulier du système nerveux central.

À l'origine, ce privilège immun fut attribué à la présence d'un drainage lymphatique cérébral très particulier, puis plus tard à la BHE, (Billingham et Boswell, 1953 ; Louveau *et al.*, 2015).

Cette BHE est en effet à l'origine d'un isolement du système nerveux central de la circulation périphérique, et assure un filtrage contrôlé des cellules circulantes de l'immunité de la périphérie vers le site inflammatoire cérébral.

1.2. Définition de la neuro-inflammation

L'inflammation dite « classique » se caractérise par la détection du danger par les macrophages et les cellules dendritiques et par l'accumulation et le recrutement depuis le flux sanguin de cellules

immunitaires circulantes innées ou adaptatives vers le tissu concerné (Weiner et Frenkel, 2006 ; Graeber *et al.*, 2011).

Certaines cellules peuvent néanmoins proliférer localement, dans le tissu concerné, comme les macrophages résidents : cellules de Kupffer dans le foie, ostéoclastes au niveau du tissu osseux, macrophages alvéolaires pulmonaires, cellules microgliales dans le système nerveux central,

L'inflammation s'accompagne d'altérations vasculaires et parenchymateuses des tissus ainsi que des changements dans ses capacités prolifératives. C'est cette infiltration de cellules circulantes inflammatoires qui est à l'origine de la destruction tissulaire induite par la réponse inflammatoire.

La **neuro-inflammation**, quant à elle, correspond à l'activation des cellules gliales (cellules microgliales et astrocytes), et à la libération accrue de facteurs inflammatoires dans le SNC. Elle se caractérise davantage par l'implication de cellules immunitaires innées résidentes du système nerveux central (les cellules microgliales), mais aussi les astrocytes, que par l'infiltration de cellules périphériques du système immunitaire (granulocytes, macrophages, lymphocytes).

Ainsi, certains auteurs préfèrent au terme « neuro-inflammation », qui doit classiquement se référer aux caractéristiques communément admises de l'inflammation (en particulier l'infiltration de cellules périphériques circulantes), le terme d'« **activation gliale** » ; ou à défaut de « pseudo-inflammation » du SNC car on ne peut pas à proprement parler d'« inflammation », puisqu'il n'y a pas de recrutement de cellules périphériques du système immunitaire (Bechmann, 2005 ; Graeber *et al.*, 2011).

1.3. Protagonistes cellulaires

1.3.1. Microglie

1.3.1.1. Rôles en conditions physiologiques

Les cellules microgliales sont des macrophages résidents du parenchyme cérébral présentes de façon ubiquitaire dans tout le système nerveux central et représentent 10 % de la population gliale dans l'encéphale (Weiner et Frenkel, 2006). Elles sont originaires de la lignée monocytes/macrophages et possèdent une communauté antigénique, ainsi qu'un grand nombre de marqueurs et de propriétés en commun avec les cellules immunitaires périphériques issues de la lignée monocytes/macrophages. En effet, des anticorps monoclonaux dirigés contre la microglie reconnaissent également des macrophages périphériques.

Les cellules microgliales sont très polymorphes et présentent ainsi plusieurs phénotypes dépendant de l'environnement dans lequel elles se trouvent (Tritsch *et al.*, 1999).

Les cellules microgliales peuvent se présenter sous deux états dont la morphologie est caractéristique : un état quiescent dit « au repos » qui présente une morphologie ramifiée et un état « activé » présentant une morphologie amiboïde. Ces variations morphologiques s'accompagnent de variations fonctionnelles selon l'état d'activation de la microglie (capacité de phagocytose et de migration, expression de marqueurs spécifiques).

En conditions physiologiques, la microglie est de morphologie ramifiée (en repos) et présente de nombreux prolongements cytoplasmiques le long des faisceaux nerveux.

De par leur capacité de phagocytose, leurs multiples prolongements, leur répartition ubiquitaire et leur nombre important, les cellules microgliales sont les sentinelles du SNC. Ce phénotype peu activé est maintenu grâce à des facteurs solubles sécrétés par les neurones avec qui elles sont en contact étroit.

Dans leur état « de repos » les cellules microgliales assurent le support trophique des neurones, favorisent la remyélinisation et l'oligodendrogenèse et peuvent éliminer les cellules apoptotiques (Tritsch *et al.*, 1999).

Elles éliminent les substances étrangères qui pourraient s'introduire dans le parenchyme cérébral, et leur activation, déclenchée par une agression est à l'origine d'une réponse inflammatoire par la sécrétion de marqueurs spécifiques de l'inflammation, de molécules nécessaires à la présentation d'antigène et l'expression d'un répertoire de protéines membranaires spécifiques les rendant plus sensibles aux variations fines (homéostasie ionique notamment), précédant les altérations tissulaires.

1.3.1.2. Activation microgliale et inflammation

Bien que le parenchyme cérébral présente un « privilège immun », des réactions neuro-inflammatoires ont quand même lieu dans le SNC. En conditions infectieuses, inflammatoires ou lors de dégénérescence, les cellules microgliales se trouvent dans un état activé et sont effectrices de la réponse immunitaire dans le SNC : la microglie devient en effet présentatrice d'antigène par l'expression à sa surface du CMH classe II (Streit *et al.*, 1999).

L'activation microgliale apparaît lors de la détection par des récepteurs microgliaux, les PRR ("Pattern Recognition Receptors") de profils moléculaires extrêmement variés associés à des pathogènes : les PAMP ("Pathogen Associated Molecular Patterns") ou associés à des situations de danger, les DAMP ("Danger Associated Molecular Patterns"). La microglie peut être également

activée indirectement par des cytokines. Les agrégats d'A β , considérés comme matériels « étrangers » par la microglie, déclenchent aussi leur activation (Weiner et Frenkel, 2006).

Lorsque la microglie est activée, sa capacité de phagocytose est augmentée. Ainsi, elle a un rôle essentiel dans la phagocytose des micro-organismes, et de leur présentation antigénique via le CMH, dans la phagocytose des débris cellulaires qui pourraient être délétères, et a un rôle dans la réparation tissulaire après lésion. Elle est également responsable de la sécrétion de facteurs neurotrophiques comme le BDNF (« Brain-Derived Neurotrophic Factor »), les neurotrophines et le TGF β -1 (« Transforming Growth Factor »).

La microglie activée libère des protéases, des dérivés de l'acide arachidonique, du glutamate (à l'origine d'une excito-toxicité), des cytokines anti- et pro-inflammatoires (respectivement IL-4, IL-10, IL-13 et IL-1 β , IL-6, TNF α), des facteurs chimioattractants, des facteurs cytotoxiques comme le monoxyde d'azote (NO) et des radicaux libres neurotoxiques (Tritsch *et al.*, 1999 ; Weiner et Frenkel, 2006).

L'ensemble de ces répertoires d'expression protéique à la surface et de molécules relarguées, ainsi que leur équilibre sont à l'origine d'un phénotype particulier de la microglie, lorsque celle-ci est activée, et détermine si l'intervention microgliale est bénéfique (profil M1) ou délétère (profil M2). En effet, dans certaines conditions neuro-inflammatoires, notamment dans de nombreuses affections du SNC, lorsque leurs capacités phagocytaires sont dépassées, les cellules microgliales peuvent être à l'origine d'une exacerbation de l'inflammation par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et neurotoxiques.

Une fois l'inflammation jugulée, les cellules microgliales quittent leur état d'activation et retournent vers leur morphologie de repos. Au cours d'une inflammation chronique, et du vieillissement normal, la microglie effectue de moins en moins efficacement ce retour à l'état de repos, conduisant progressivement, avec l'âge, à la mise en place d'un état neuro-inflammatoire.

1.3.2. Astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales du SNC remarquables par leur forme étoilée. Cette morphologie est très variable selon leur stade de développement, de la région du SNC, ou des conditions physiopathologiques rencontrées. Les astrocytes présentent un petit corps cellulaire (de 5 à 10 μ m) doté de multiples prolongements cytoplasmiques se terminant par des « pieds astrocytaires » qui sont des zones de contact élargies avec les neurones, les cellules endothéliales des capillaires

sanguins, les oligodendrocytes, les cellules microgliales et les autres astrocytes. Les astrocytes sont ainsi le carrefour obligé des différents types cellulaires du SNC (Tritsch *et al.*, 1999 ; Liddelow *et al.*, 2017).

Les astrocytes ont un rôle de soutien trophique et énergétique des neurones, de maintien de l'homéostasie extracellulaire (notamment en potassium et en eau), dans la neurotransmission par la recapture et le recyclage de neurotransmetteurs, la neuroplasticité par son rôle dans la formation, la maturation et l'élimination des synapses et dispose de facultés anti-oxydantes.

Ils agissent de plus en synergie avec les cellules microgliales par la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires, la modulation de la présentation antigénique et avec les cellules endothéliales vasculaires en assurant l'établissement et le maintien de la BHE (Tritsch *et al.*, 1999).

La position centrale des astrocytes dans le SNC se traduit par un changement phénotypique lorsque le tissu cérébral est sujet à une agression et/ou lésion. Les astrocytes passent alors d'un état « non réactif » à un état « réactif » se caractérisant par une succession d'altérations morphologiques et fonctionnelles. Cette transformation porte le nom de gliose réactionnelle ou astrogliose. Un des marqueurs immunohistologiques le plus utilisé de la réactivité astrocytaire est la protéine gliofibrillaire GFAP qui est un filament intermédiaire de l'astrocyte surexprimé au cours de l'activation astrocytaire (Pekny *et al.*, 2014 ; Brenner, 2014).

Cette gliose réactionnelle se produit dans n'importe quelle région cérébrale et est une réponse très conservée dans l'évolution. Elle s'initie très rapidement et peut se maintenir plusieurs années durant. Deux voies majoritaires mènent à cette gliose réactionnelle : via l'activation de la microglie ou via une activité électrique exacerbée des cellules neuronales et la libération accrue du glutamate (Liddelow *et al.*, 2017).

De multiples changements fonctionnels accompagnant cette réactivité astrocytaire ont été identifiés, sans pour autant que leurs effets bénéfiques ou délétères soient élucidés : déficit dans l'homéostasie glutamatergique et potassique, libération de gliotransmetteurs, altération de la détoxification des formes réactives de l'oxygène, de la libération des molécules trophiques et du cholestérol.

2. La neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer

2.1. Implication des cellules gliales dans la maladie d'Alzheimer

Dans la maladie d'Alzheimer, les dépôts d'A β sont à l'origine d'une activation des cellules de l'immunité innée. Les images immunohistologiques montrent d'ailleurs la co-localisation et l'étroite association des plaques séniles, et des cellules microgliales et astrocytes activés (Leinenga et Götz, 2015 ; Heneka *et al.*, 2015).

En réponse aux dépôts d'A β , les cellules microgliales activées surexpriment différentes protéines de surface comme le CMH II, CD11b, les récepteurs *scavengers*, et produisent des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 et TNF. Par la modification de leur arsenal protéique, les cellules microgliales acquièrent de nouvelles propriétés, comme une amélioration de leur capacité de phagocytose par la surexpression de récepteurs *scavengers* impliqués dans la neutralisation de matériel étranger ou acquérir des propriétés neurotoxiques par l'augmentation de leur production de formes réactives de l'oxygène.

En conditions physiologiques, le peptide A β est éliminé sans troubles par les effecteurs de l'immunité innée cérébrale. En effet, les cellules microgliales reconnaissent ces peptides A β grâce à leurs récepteurs comme les TLR2/TLR4 (*Toll Like Receptor*), LRP1 (*LDL Receptor-related Protein 1*) et RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) qui sont exprimés à leur surface, (Wang *et al.*, 2016). L'activation gliale est également à l'origine d'une sécrétion par la glie et les neurones d'endopeptidases dans le milieu extracellulaire assurant la dégradation des peptides A β : *Insulin Degrading Enzyme* (IDE), *Endothelin Converting Enzyme* (ECE), néprilysine (Nalivaeva *et al.*, 2014).

Un « filtrage » des peptides A β à travers la BHE et le drainage des peptides A β dans le LCS permettent également de réduire la charge amyloïde du parenchyme cérébral vers le sang ou le LCS.

L'augmentation progressive de l'A β au-delà d'un seuil où les cellules microgliales ne sont plus capables d'assurer la clairance des plaques est une des hypothèses privilégiées sur la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'activation des cellules microgliales par l'A β et leur switch

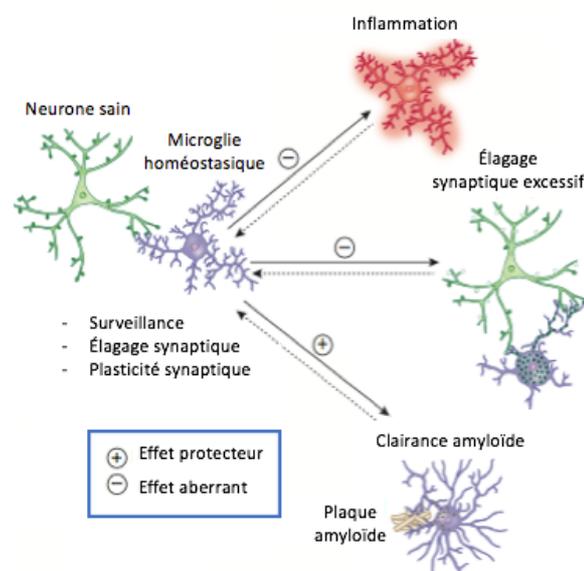
phénotypique vers un phénotype neurotoxique peut également avoir un rôle pathologique dans les stades précoces de la maladie (Weiner et Frenkel, 2006).

En effet, au fur et à mesure de la progression de la maladie, la microglie semble perdre sa capacité bénéfique de clairance de l'amyloïde tandis qu'elle acquiert progressivement un phénotype toxique par activation chronique et une production continue de médiateurs pro-inflammatoires.

Les rôles attribués à la neuro-inflammation sont nombreux et contradictoires dans la pathogenèse des plaques amyloïdes et de la dégénérescence neurofibrillaire, (Heneka et al., 2015). Dans une étude de 2016, Hamelin *et al.* ont suivi l'activation microgliale par imagerie TEP d'un radioligand de l'activation microgliale. Cette activation microgliale apparaissait précocement, avant les premiers signes de la maladie, et était corrélée positivement à une progression plus lente de la maladie. Cette activation microgliale jouerait ainsi un rôle protecteur sur son apparition. Cette étude n'exclut pas que cette inflammation puisse néanmoins être néfaste dans des stades plus avancés de la maladie (Hamelin *et al.*, 2016).

En effet, plusieurs études supportent l'hypothèse selon laquelle l'activation microgliale serait à l'origine d'une clairance des plaques amyloïdes, cependant, le switch qui s'opère entre cet état microglial bénéfique vers un état neurotoxique n'est pas encore bien compris et pourrait être le point pathogénique clé dans la mise en place d'une immunothérapie anti-amyloïde (Figure 9) (Salter et Stevens, 2017).

Figure 9 : : États fonctionnels sain et délétère de la microglie. D'après (Salter et Stevens, 2017).



Il est cependant clair que la microglie n'intervient pas seule dans le processus pathologique. Les astrocytes notamment, par leur position de médiateurs dans la plupart des processus neurobiologiques, sont des interlocuteurs majeurs des cellules microgliales, et l'interaction de ces deux protagonistes est indissociable de l'activation gliale.

L'astrogliose est une manifestation pathologique de la maladie d'Alzheimer en réponse à l'accumulation d'A β et à la mort neuronale et synaptique. Cette astrogliose (que l'on peut suivre à l'aide du marqueur astrocytaire GFAP en immunohistochimie), apparaît notamment autour des dépôts amyloïdes. Les astrocytes, à la différence des cellules microgliales sont capables de migrer jusqu'aux plaques amyloïdes guidés par des chémokines comme la CCL2 et la CCL3 sécrétées par les cellules microgliales activées localisées autour des plaques. Le rôle de ces astrocytes recrutés autour des plaques est complexe, puisqu'ils participent à la fois à la clairance amyloïde (en modulant la phagocytose des plaques par les cellules microgliales) et à la neurotoxicité (DeWitt *et al.*, 1998).

Les astrocytes, comme les cellules microgliales présentent de multiples phénotypes dont la fonctionnalité et les propriétés sont variées. Il est probable que certains phénotypes disposent de propriétés bénéfiques ou délétères dans la maladie suivant le phénotype considéré.

Sur ce courant de pensée, Liddelow et son équipe ont pu mettre en évidence l'induction par la microglie activée d'un phénotype astrocytaire neurotoxique A1 (par opposition au phénotype astrocytaire protecteur A2 et par analogie à la dichotomie des macrophages type M1 pro-inflammatoires et macrophages type M2 anti-inflammatoires). En effet, il a été montré que les cellules microgliales activées, par la sécrétion de IL1 α , TNF α , et C1q, induisaient un phénotype astrocytaire nocif de type A1. Les astrocytes A1 perdent leur capacité à promouvoir la survie et la croissance neuronale ainsi que la fonctionnalité et la formation des synapses et la phagocytose des débris de myéline et des synapses (Liddelow *et al.*, 2017).

Ces astrocytes de type A1 conduiraient à la neurodégénérescence par la sécrétion d'une neurotoxine, non identifiée encore, et par la libération de composants du complément responsables de la dénérescence des synapses.

De plus, une grande quantité d'astrocytes de type A1 sont retrouvés dans les zones de neurodégénérescence en post-mortem dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces récentes découvertes ouvrent de nouvelles possibilités thérapeutiques dans l'élaboration de nouvelles drogues stoppant l'induction du phénotype A1, ou promouvant la réversion A1 vers A2 (Liddelow *et al.*, 2017).

Finalement, astrocytes et cellules microgliales sont deux acteurs clés de la neuro-inflammation, mais leurs rôles sont complexes et multiples et le défi demeure de soutenir davantage les cascades immunitaires bénéfiques sans causer de dommages supplémentaires, et vice versa. Le suivi des mécanismes neuro-inflammatoires relève ainsi d'un enjeu majeur pour la compréhension des voies inflammatoires empruntées mais également pour la mise au point d'une médecine de précision et de thérapies ciblées et personnalisées pour chaque type de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Car la question demeure : quelles sont les voies empruntées par ces cellules gliales au cours de la progression de la maladie d'Alzheimer, et à quel moment de la maladie ?

Dans cette optique, de nombreux biomarqueurs de la neuro-inflammation ont été identifiés et exploités.

2.2. Les modulateurs de la neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer

Les agrégats protéiques d'A β sont détectés comme éléments étrangers et reconnus par les récepteurs PRR présents à la surface des cellules microgliales et astrocytes. Ceci est à l'origine du déclenchement d'une réponse inflammatoire libérant de nombreux médiateurs inflammatoires et pouvant contribuer à la progression de la maladie et sa gravité. Ainsi, plusieurs études ont permis de mettre en évidence les différents protagonistes inflammatoires intervenant dans la maladie d'Alzheimer.

Les cytokines, en premier lieu, sont les modulateurs majoritaires de la neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer. Sécrétées par les cellules microgliales et les astrocytes, elles sont à la fois responsables des processus pro-inflammatoires comme des processus anti-inflammatoires. Elles ont également un rôle dans la chimioattraction d'autres protagonistes inflammatoires, et induisent la réponse microgriale lors de dépôts d'A β (Heneka *et al.*, 2015).

Lors de la maladie d'Alzheimer, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) est en effet accrue lorsque les cellules microgliales sont exposées à des agrégats d'A β ₄₂. Cela a notamment été montré *in vitro* sur des cultures de tissus cérébraux de patients Alzheimer (Lue *et al.*, 2001).

De plus, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer dont le taux dans le LCS de TNF α (cytokine pro-inflammatoire) est le plus élevé et le taux de TGF- β (cytokine anti-inflammatoire) est le plus faible, sont plus à risque de basculer du stade de démence légère (*mild cognitive impairment*) au stade Alzheimer (Tarkowski *et al.*, 2003).

Paradoxalement à ces premières observations, il a été montré qu'une stimulation des voies de signalisation pro-inflammatoires (par l'expression de la cytokine IL1- β) chez la souris *APP/PS1* conduisait à un phénomène neuro-inflammatoire important et plutôt bénéfique puisqu'il permettait à la réduction des plaques amyloïdes (Ghosh *et al.*, 2013). De même, l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-4 était à l'origine d'une augmentation des dépôts d'A β (Chakrabarty *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent qu'il n'existerait pas de « bonnes » ou « mauvaises » cytokines, mais plutôt des « bonnes » et « mauvaises » voies d'activation microgliale aboutissant *in fine* à un phénotype inflammatoire bénéfique versus délétère.

Les caspases sont des protéases exécutrices dont les fonctions dans la mort cellulaire programmée et l'inflammation sont bien connues. La caspase 1 est notamment impliquée dans le clivage et l'activation de la cytokine IL-1 β en cytokine active. Ainsi, il a pu être montré que plusieurs caspases étaient plus ou moins directement impliquées dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer. En effet, les caspases 3/7 et 8 sont davantage activées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, alors que leur *knockdown*, chez la souris, est à l'origine d'une diminution de l'activation microgliale (Burguillos *et al.*, 2011). Ces protéases sont davantage considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles, dont l'inhibition pourrait montrer des effets neuroprotecteurs grâce à la modulation de l'activité microgliale neurotoxique.

De façon moins majoritaire, l'implication des facteurs du complément dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer a pu être mise en évidence. Les molécules du complément sont en effet des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée. Au niveau du SNC, les molécules du complément sont principalement sécrétées par les cellules microgliales, et dans une moindre mesure les astrocytes, et ils seraient dans une certaine mesure impliqués dans l'agrégation des peptides A β (Strohmeier *et al.*, 2002).

Enfin, il a également été montré que certaines cytokines pouvaient activer la NO synthase inducible des cellules microgliales et astrocytes et induire une production accrue de NO. En effet, les patients Alzheimer présenteraient une activation de la NO synthase inducible (Vodovotz *et al.*, 1996), et le knockout de la NO synthase inducible a montré des effets neuroprotecteurs chez la souris modèle de la maladie d'Alzheimer (Nathan *et al.*, 2005). Ces taux élevés de NO sont toxiques pour les neurones et participeraient à la mort neuronale.

Le NO est de plus responsable d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles des protéines, comme la nitration et la nitrosylation. Il est notamment responsable de la nitration du peptide A β , ce qui augmenterait sa capacité à s'agréger et à former des plaques (Kummer *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces médiateurs neuro-inflammatoires identifiés dans la pathogénie de la maladie d'Alzheimer sont responsables d'une altération de l'environnement moléculaire et cellulaire du SNC par la perturbation des interactions intercellulaires qui maintiennent la microglie dans un état physiologique. La question du « quand » et du « comment » reste encore un sujet brûlant dans la compréhension du rôle de la neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer.

La compréhension du rôle de la neuro-inflammation dans le SNC nécessite l'étude du décours temporel de l'activation microgliale aux différents stades de la maladie d'Alzheimer. Dans l'optique de suivre *in vivo* les différents stades de l'activation microgliale et astrocytaire, de nombreux radiotraceurs pour l'imagerie tomographique par émission de positons (TEP) ont été développés ces dernières dizaines d'années.

2.3. Monitoring de la neuro-inflammation : la protéine translocatrice 18 kDa TSPO

De nombreux biomarqueurs de la neuro-inflammation sont aujourd'hui utilisés pour mettre en évidence les phénomènes inflammatoires prenant place dans le parenchyme cérébral. Du fait de l'isolement du parenchyme cérébral de la circulation sanguine, les biomarqueurs circulants classiques de l'inflammation, du sérum ou du plasma (cytokines, ...), sont de moins bons candidats pour témoigner de la neuro-inflammation. Ainsi les biomarqueurs de l'activation microgliale et astrocytaire sont davantage employés en recherche préclinique. On peut citer les biomarqueurs CD68, Iba1, CD11b, TREM2, spécifiques de l'activation microgliale ou la GFAP pour l'activation astrocytaire. Ces derniers correspondent pour la plupart à des marquages immunohistochimiques réalisés *ex vivo* (Hopperton *et al.*, 2018).

Des efforts considérables ont pu être déployés dans le développement de techniques non invasives, réalisables *in vivo*, afin de suivre au cours d'études longitudinales l'activation des cellules gliales, la progression de ces maladies neuro-inflammatoires, et l'efficacité des thérapies mises en place chez des modèles animaux et des patients atteints de maladies neurodégénératives.

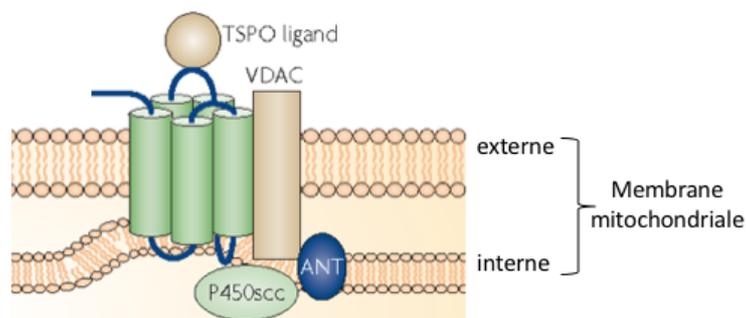
L'imagerie par TEP de la protéine translocatrice 18 kDa (TSPO) a pu ainsi s'imposer comme un puissant outil dans la surveillance de la neuro-inflammation chez les animaux modèles et les humains.

La protéine translocatrice 18 kDa TSPO (pour TranSlocator Protein), aussi connue sous le nom de PBR (peripheral benzodiazepine receptor) est une protéine mitochondriale ubiquitaire formée de 5 hélices α transmembranaires et liant des drogues et le cholestérol.

La protéine translocatrice 18 kDa TSPO désigne *sensu stricto* le monomère du complexe PBR, c'est-à-dire l'unité fonctionnelle minimale liant le cholestérol et les drogues. Ce complexe PBR multimérique de 140-200 kDa est situé sur la membrane mitochondriale externe et comprend en plus de cette unité fonctionnelle de 18 kDa (Figure 10) :

- Un canal perméable aux anions voltage dépendant VDAC (pour *Voltage Dependant Anion Chanel*) de 32 kDa.
- Un translocateur de nucléotides à adénine ANT (pour *Adenine Nucleotide Translocase*) de 30 kDa (Papadopoulos *et al.*, 2006).

Figure 10 : La protéine translocatrice 18 kDa TSPO. D'après Rupprecht *et al.*, 2010.



Le rôle principal de la TSPO est la réalisation de la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane mitochondriale interne. La TSPO est fortement présente dans les tissus sécrétant des stéroïdes, comme les surrénales, les ovaires, les testicules et le placenta, ainsi que dans les tissus à prolifération rapide. Elle est impliquée dans la stéroïdogénèse, dans certaines fonctions mitochondriales et dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ses ligands naturels comprennent l'isoquinoline, les carboxamides, benzodiazépines et ses dérivés (Damont *et al.*, 2013 ; Crawshaw et Robertson, 2017). En conditions normales, son expression est très faible dans le parenchyme cérébral.

De façon plus remarquable, la TSPO, qui est exprimée au niveau des cellules gliales, est surexprimée en conditions neuro-inflammatoires, ce qui en fait un bon candidat comme biomarqueur de la neuro-inflammation. Des radioligands sélectifs de la protéine TSPO ont ainsi pu être développés et sont largement utilisés en imagerie TEP.

Le ¹¹C-(R)-PK11195 [N-méthyl-N- (1-méthylpropyl) -1- (2-chlorophényl) -isoquinoline-3-carboxamide], a été l'un des premiers radioligands sélectifs de TSPO ayant montré une augmentation du taux de TSPO dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, (Cagnin *et al.*, 2001).

Plusieurs autres radioligands de TSPO, traversant la BHE, ont depuis lors pu être développés, comme le ¹⁸F-DPA-714 [N, N-diéthyl-2- (2-(4- (2- [18F] fluoroéthoxy) phényl) -5,7-diméthylpyrazolo [1,5-a]pyrimidin-3-yl) acétamide] (James *et al.*, 2008 ; Rupprecht *et al.*, 2010).

3. La barrière hémato-encéphalique : entre protection et inaccessibilité, une nouvelle piste thérapeutique ?

3.1. Définition et structure de la barrière hémato-encéphalique

Le cerveau est isolé du reste de l'organisme par la BHE qui contrôle étroitement les échanges entre les compartiments sanguin et cérébral.

Au terme historique de « barrière » défini en raison de sa fonction, succède aujourd'hui le terme « d'unité neurovasculaire », qui reflète de manière plus juste cette structure dynamique comprenant les péricytes, les astrocytes et les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins cérébraux (Tohidpour *et al.*, 2017).

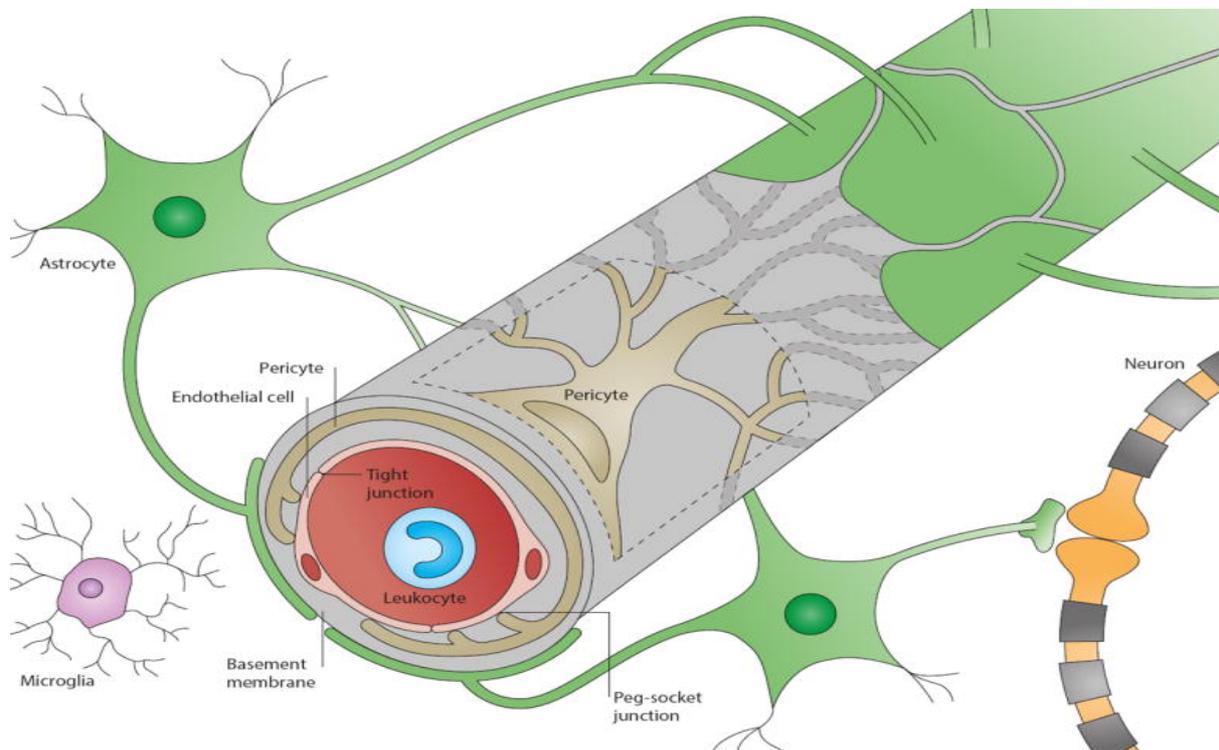
Les cellules endothéliales sont les éléments majoritaires de la BHE et sont associées en couche unique par des jonctions serrées soutenues par une lame basale. Elles constituent une barrière physique aux éléments circulants du sang périphérique. Les capillaires ainsi délimités sont majoritairement continus, limitant la diffusion des différents éléments. Il existe cependant de très nombreux phénomènes de transcytose au niveau de ces cellules endothéliales assurant la dynamique et l'échange de molécules de leur pôle basal à leur pôle apical.

Les péricytes recouvrent une grande surface des capillaires sanguins cérébraux et sont essentiels à l'intégrité de la BHE, en assurant notamment un rôle trophique auprès des cellules endothéliales. Les péricytes participent également à la clairance des métabolites.

Au niveau de la BHE, des contacts entre les astrocytes et les cellules endothéliales s'opèrent par le biais de prolongements périvasculaires entourant les capillaires cérébraux. Les péricytes participeraient à la mise en place de ces prolongements en les guidant vers les parois des capillaires et en induisant leur polarisation (Figure 11).

Astrocytes et cellules microgliales sont des éléments clés de l'unité neuro-vasculaire, et de nombreuses études suggèrent le rôle prépondérant des astrocytes le maintien de l'intégrité de la BHE.

Figure 11 : La barrière hémato-encéphalique ou unité neuro-vasculaire. D'après Obermeier et al., 2013.



Les cellules microgliales, quant à elles, sont des cellules immunitaires résidentes du SNC et sont situées à proximité des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Elles interviennent avec la BHE dans le passage des cellules immunitaires périphériques vers le parenchyme cérébral (Daneman et Prat, 2015).

3.2. Rôle et fonctions de la barrière hémato-encéphalique

La BHE a un rôle critique dans la défense immunitaire du parenchyme cérébral et dans le filtrage des cellules immunitaires périphériques issues de la lignée monocytes/macrophages au niveau de la BHE.

En cas d'agression, les cellules dendritiques localisées au niveau des espaces périvasculaires et des plexus choroïdes vont pouvoir capter les antigènes étrangers présents dans le parenchyme cérébral et emprunter des voies de drainage du LCS (qui joue alors le rôle de lymphe) jusqu'aux nœuds lymphatiques cervicaux via l'espace sous-arachnoïdien afin d'activer les cellules T.

Une fois les cellules T activées dans les nœuds lymphatiques périphériques par les cellules dendritiques, ces cellules T activées passent au niveau des plexus choroïdes vers le parenchyme cérébral si et seulement si celui-ci présente déjà un état d'activation.

En effet, cet espace arachnoïdien est un sas d'entrée dans lequel se trouvent des macrophages périphériques activés par des antigènes étrangers présents dans le parenchyme cérébral grâce à un drainage du LCS dans cet espace arachnoïde. Soit les cellules T qui ont été activées par les cellules dendritiques reconnaissent les antigènes présentés par les macrophages au niveau de l'espace arachnoïdien, et peuvent passer la BHE pour aller vers le parenchyme cérébral, soit les cellules T ne reconnaissent pas les antigènes présentés par les macrophages et ne peuvent alors pas passer la BHE.

En plus de ce passage via l'espace arachnoïdien, l'activation et le recrutement des cellules inflammatoires périphériques peuvent également avoir lieu au niveau de l'ethmoïde et via le réseau lymphatique méningé (Saijo et Glass, 2011).

En parallèle de ce rôle fonctionnel crucial dans l'activité immunitaire cérébrale, la BHE assure également une régulation drastique des échanges moléculaires entre le sang et le cerveau, et assure la protection des neurones vis-à-vis des éléments de la circulation sanguine. La BHE est de surcroît à l'origine d'un maintien hautement régulé de l'homéostasie du SNC, nécessaire au bon fonctionnement électrique et moléculaire des neurones et de leurs synapses.

Elle dispose également d'un rôle central dans le métabolisme cérébral, puisqu'en raison des besoins très importants en énergie du cerveau, de grandes quantités de métabolites sont consommées puis leurs déchets sont libérés et éliminés à travers la BHE par le biais de transports actifs.

3.3. Neuro-inflammation et barrière hémato-encéphalique : implication dans la maladie d'Alzheimer

L'unité neurovasculaire constitue la plateforme exécutrice de la neuro-inflammation grâce à la coordination des cellules neuronales, gliales et endothéliales qui coopèrent au sein de cette unité. Elle permet ainsi la mise en place de mécanismes anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires.

La production des médiateurs inflammatoires mentionnés ci-dessus (cytokines, complément, NO, *etc.*) par les cellules immunitaires résidentes ou par les cellules immunitaires provenant du sang périphérique, est à l'origine d'un déclin de l'intégrité de la BHE, ce qui participe encore davantage à son affaiblissement et au phénomène inflammatoire en cours (Tohidpour *et al.*, 2017).

L'altération de la BHE et sa rupture sont à l'origine d'une pénétration de composés sanguins neurotoxiques et d'agents pathogènes, à l'origine d'une neuro-inflammation pouvant initier des mécanismes de neurodégénérescence. Ainsi, des altérations de la BHE sont souvent associées aux processus pathogéniques de nombreuses maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer (Erickson et Banks, 2013 ; Daneman et Prat, 2015).

Alors que le rôle essentiel de la BHE dans l'homéostasie cérébrale a été largement étudié, la BHE suscite un nouvel intérêt dans l'étude des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. Son rôle dans le métabolisme et le transport des peptides A β est aujourd'hui étudié avec plus d'attention. Les premiers résultats publiés permettent d'affirmer sans ambiguïté que la BHE est un acteur majeur dans la mise en place de la maladie et suggèrent qu'elle pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer.

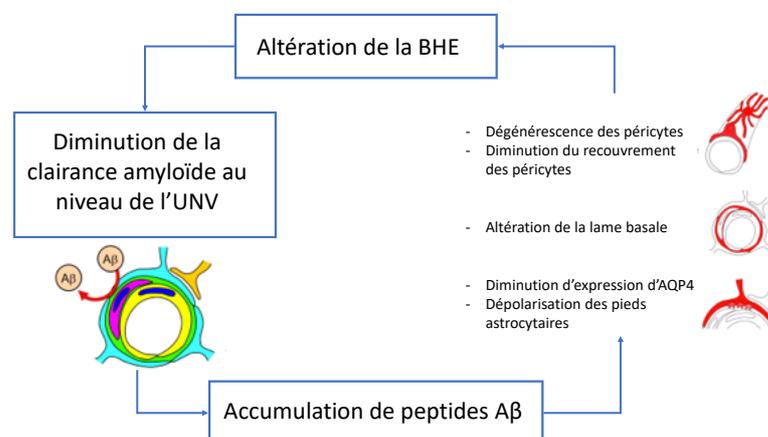
En effet, il a été démontré qu'une partie des peptides A β était éliminée au niveau de l'unité neurovasculaire. Une altération de ces mécanismes pourrait ainsi être à l'origine d'une exacerbation de l'accumulation des peptides A β et contribuer à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, par la mise en place d'un cercle vicieux entre l'accumulation d'A β et l'altération de la BHE (Yu Yamazaki et Takahisa Kanekiyo, 2017).

L'altération de la BHE lors de maladies neurodégénératives demeure encore un sujet de débat, et la nature de ses dommages dans de telles maladies reste encore à comprendre. Plusieurs altérations de la BHE ont cependant été identifiées dans les cerveaux de patients ou de souris atteints de la maladie d'Alzheimer, et pourraient participer à ce cercle vicieux (Figure 12) :

- Une diminution des protéines constituant les jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales de la BHE, mise en évidence *post mortem* sur des cerveaux humains Alzheimer (Carrano *et al.*, 2012) ;
- Une diminution du recouvrement des vaisseaux par les péricytes dans les cerveaux Alzheimer, comparativement aux cerveaux sains (Sengillo *et al.*, 2013). De plus, il a été mis en évidence que l'accélération des dépôts A β , de l'altération de la clairance d'A β_{40} et A β_{42} , en plus de l'apparition de lésions tau, chez des souris déficientes en péricytes modèles d'amyloïdose, comparativement aux souris sans déficience en péricytes (Sagare *et al.*, 2013) ;
- La rétraction des pieds astrocytaires au voisinage des dépôts amyloïdes (Merlini *et al.*, 2011), ainsi que la diminution de l'expression de l'aquaporine 4 (AQP4) et sa redistribution depuis les pieds astrocytaires jusque sur des régions plus en amont des astrocytes (en dehors de l'unité neurovasculaire), dans un modèle souris d'amyloïdose (Yang *et al.*, 2011). Une diminution de l'AQP4 serait à l'origine d'une altération de la clairance d'A β_{40} (Iliff *et al.*, 2012) ;
- Un amincissement de la lame basale des capillaires cérébraux des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Farkas et Luiten, 2001) ;
- Une diminution des protéines de transport du peptide A β du parenchyme vers le LCS, à savoir une diminution de la protéine LRP1 sur les cellules endothéliales de la BHE chez les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et souris modèles d'Alzheimer (Deane *et al.*, 2004), une diminution du transporteur Pgp chez des souris modèles d'Alzheimer au voisinage des plaques amyloïdes (Park *et al.*, 2014), ainsi que la corrélation entre sa déficience et l'arrêt de la clairance amyloïde et l'augmentation des dépôts d'A β (Cirrito, 2005).

Figure 12: Implication de la barrière hémato-encéphalique dans la maladie d'Alzheimer. D'après Yamazaki et Kanekiyo, 2017.

BHE : Barrière hémato-encéphalique. **UNV :** Unité neuro-vasculaire.



3.4. Nouveaux horizons thérapeutiques : la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

Bien que le rôle protecteur de la BHE soit essentiel pour la viabilité du tissu cérébral, la BHE est de plus en plus apparue comme un obstacle vis-à-vis des différentes approches thérapeutiques. En effet, en plus de la boîte crânienne qui rend impossible toute intervention extérieure non invasive, la BHE est à l'origine d'un isolement du SNC vis-à-vis des molécules thérapeutiques administrées par voie systémique (Miller et O'Callaghan, 2017).

De plus, comme la plupart des maladies neurodégénératives n'affectent pas l'ensemble du SNC, la délivrance de molécules thérapeutiques dans des régions spécifiques du SNC est hautement invasive (injection directe, craniotomie, canulation, *etc.*), et les autres techniques de délivrance de molécules sont confrontées au problème majeur de la dilution qui s'opère dans tout le parenchyme cérébral du fait de la distance de trajet qu'elles doivent effectuer pour parvenir jusqu'au site cible d'intérêt.

L'utilisation récente des ultrasons pour l'ouverture de la BHE a pu apporter des solutions techniques à ces impasses thérapeutiques pour la délivrance focalisée de molécules thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives (Miller et O'Callaghan, 2017).

À cette émission transcrânienne d'ultrasons, est associée l'injection intraveineuse de microbulles. Ces microbulles ont la taille d'un globule rouge (8-10 μ m) et sont stabilisées par une capsule lipidique et protéique empêchant leur dispersion rapide dans le sang. Les ultrasons émis activent alors les microbulles lorsque celles-ci rencontrent les faisceaux convergents des ondes acoustiques émises. Ceci est à l'origine de dilatations/contractions du cœur gazeux des microbulles (appelées forces de cavitation), produisant un stress de cisaillement contre les parois vasculaires et conduisant à l'ouverture mécanique des jonctions serrées qui scellent les cellules endothéliales composant la BHE (Miller et O'Callaghan, 2017).

L'administration conjointe de microbulles à l'émission des ultrasons permet ainsi d'ouvrir la BHE, et serait à l'origine d'une prolifération cellulaire et d'une neurogenèse dans les hippocampes. Ces effets pourraient être dus à la stimulation de la sécrétion de facteurs trophiques et de croissance comme le BDNF, VEGF, bFGF (Yoo *et al.*, 2011 ; Scarcelli *et al.*, 2014).

Ainsi, l'implication de la BHE dans les maladies neurodégénératives est étudiée avec un nouvel intérêt, et l'utilisation d'ultrasons combinée à l'injection de microbulles pourrait constituer une

nouvelle approche rapide, efficace et non invasive dans la délivrance de molécules thérapeutiques jusqu'au cerveau dans le traitement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En effet, la plupart des thérapies proposées à l'heure actuelle ne traverse par efficacement la BHE (anticorps, gènes, facteurs de croissance, cellules souches, *etc.*). Par exemple, seulement 0,1 à 2 % des anticorps anti-A β injectés passent la BHE. Toutefois, les succès thérapeutiques obtenus en recherche préclinique suggèrent que leur utilisation en clinique pour le traitement des patients atteints de la maladie d'Alzheimer pourrait ouvrir une nouvelle voie dans le développement de stratégies thérapeutiques non invasives, alors qu'aucun traitement ne permet de guérir de la maladie d'Alzheimer à ce jour (Miller et O'Callaghan, 2017).

TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. Contexte et intérêt de l'étude : état de l'art

Aujourd'hui, la principale limite à l'efficacité des traitements contre les maladies du SNC réside dans l'incapacité des molécules thérapeutiques à traverser la BHE et à atteindre le parenchyme cérébral.

Pour résoudre cette problématique, le CEA NeuroSpin a réalisé depuis 2010, plusieurs études reconnues sur l'utilisation des ultrasons transcrâniens pour la perméabilisation transitoire de la BHE sans dommage tissulaire, ceci dans l'espoir de faire parvenir davantage de molécules thérapeutiques au sein du parenchyme cérébral (Marty *et al.*, 2012 ; Magnin *et al.*, 2015).

En 2015, Leinenga et Götz ont eu l'idée d'effectuer des ouvertures de la BHE par ultrasons, non pas pour faire parvenir davantage de molécules thérapeutiques au sein du parenchyme cérébral mais plutôt dans le but de soustraire des molécules néfastes pour le système nerveux, comme les peptides A β (Leinenga et Götz, 2015). Il est alors apparu que l'application d'ultrasons transcrâniens chez la souris modèle de la maladie d'Alzheimer était à l'origine d'une clairance amyloïde, qui était de plus associée à l'amélioration des performances cognitives.

Ce « nettoyage » serait lié à une activation microgliale. En 2016, par une approche protéomique, Kovacs *et al.* ont pu démontrer, après un traitement ultrasons chez des rats sains, la sécrétion précoce de cytokines pro-inflammatoires, potentiellement par la microglie activée qui pourrait être ensuite responsable d'une sécrétion un peu plus tardive de cytokines anti-inflammatoires (Kovacs *et al.*, 2017). Ces cytokines inflammatoires pourraient être à l'origine des effets thérapeutiques des ultrasons induits observés chez les modèles rongeurs de la maladie d'Alzheimer. Ces résultats mis en perspectives avec l'étude sur patients atteints de la maladie d'Alzheimer d'Hamelin *et al.*, permettent de formuler une hypothèse de recherche selon laquelle il existerait un phénomène inflammatoire bénéfique, non caractérisé encore, déclenché par la perméabilisation de la BHE (Hamelin *et al.*, 2016).

Au-delà de l'engouement et de l'espoir thérapeutique que représentent ces récentes découvertes pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, il est apparu indispensable de comprendre ce mécanisme neuro-inflammatoire thérapeutique impliqué dans le nettoyage des plaques amyloïdes et l'amélioration des symptômes cognitifs des rongeurs modèles de la maladie d'Alzheimer lorsqu'ils sont traités par des perméabilisations transitoires de la BHE par ultrasons.

L'imagerie et la quantification de cibles moléculaires impliquées dans la neuro-inflammation sont d'un intérêt considérable pour aider la compréhension mécanistique de l'impact des ultrasons sur le cerveau d'une manière générale, grâce notamment au suivi de différents ligands radioactifs par l'imagerie TEP de la protéine translocatrice TSPO. En effet, la TSPO est à l'heure actuelle considérée comme un marqueur de la neuro-inflammation puisque l'activation des cellules microgliales et astrocytes s'accompagne en particulier d'une surexpression de la TSPO située dans les mitochondries de ces cellules gliales (Crawshaw et Robertson, 2017 ; Chaney *et al.*, 2018).

L'effet neuro-inflammatoire thérapeutique des ultrasons n'a à ce jour pas encore été étudié sur des modèles de la maladie d'Alzheimer par des techniques d'imagerie réalisables *in vivo* au cours d'études longitudinales.

Cet abord nouveau est une étape significative avant l'élaboration ultérieure d'une thérapie anti-amyloïde innovante et non invasive directement applicable chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Pour la première fois, l'interaction des cellules gliales et des ultrasons a ainsi été étudiée par imagerie TEP au Service Hospitalier Frédéric Joliot, CEA Orsay, sur des animaux non transgéniques et sur des animaux transgéniques *APP/PS1* modèles de la maladie d'Alzheimer traités périodiquement par ultrasons.

2. Cadre de l'étude et problématique

2.1. Objectif de l'étude

Plusieurs études ont pu démontrer l'effet thérapeutique d'une ouverture transitoire et répétée de la BHE par ultrasons transcrâniens sur les fonctions mnésiques des souris et sur la clairance amyloïde. Des données préliminaires ont pu également montrer l'internalisation des A β dans les lysosomes microgliaux à la suite d'un protocole classique de 6 semaines de traitement par ultrasons administré périodiquement (Leinenga et Götz, 2015).

Dans un premier temps, des tests comportementaux ont été mis en place sur une première cohorte d'animaux ayant subi un protocole d'ultrasons afin de mettre en évidence une potentielle restauration des fonctions mnésiques des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

Dans un deuxième temps, et sur une deuxième cohorte d'animaux, l'objectif de cette étude a été d'étayer et de confirmer les résultats précédemment publiés en testant l'hypothèse d'une neuro-inflammation thérapeutique induite par les ultrasons par la réalisation d'imagerie TEP consécutivement à chaque session d'ultrasons, afin d'apporter davantage de connaissances sur la chronologie neuro-inflammatoire qui s'opère lors d'un traitement périodique de six semaines d'ultrasons.

L'effet plus ou moins direct des ultrasons sur les cellules gliales et l'effet sur la clairance amyloïde ont de plus été révélés par des autoradiographies et immunohistochimies réalisées après euthanasie des animaux, dans le but de localiser la cinétique TSPO dans les différentes cellules gliales à la fin d'un traitement par ultrasons.

Conjointement, la quantification de la charge amyloïde par western blot permettra d'étayer ces résultats et de confirmer l'effet thérapeutique observé chez les souris $APP_{swe} \times PSI_{dE9}$ traitées par ultrasons.

2.2. Choix du modèle animal : la souris $APP_{swe}/PSEN1_{dE9}$

À ce jour, les mutations de trois gènes identifiés sont considérées comme ayant un rôle et participant au développement de la maladie d'Alzheimer : les gènes de la préséniline 1 (*PSEN1* ou *PS1*), de la préséniline 2 (*PSEN2* ou *PS2*), et de la protéine précurseur de l'amyloïde (*APP*) situés respectivement sur les chromosomes 14, 1, et 21.

Les produits de ces gènes sont impliqués dans le clivage de l'APP et son trafic (Müller et Deller, 2017).

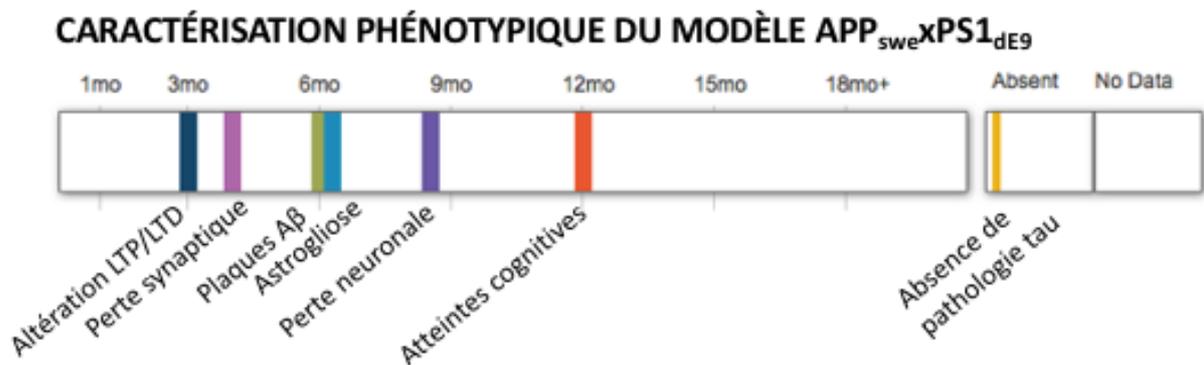
Les connaissances limitées disponibles à l'heure actuelle sur les effets des lésions amyloïdes ainsi que le manque d'approches thérapeutiques efficaces ont motivé la création d'un large spectre de modèles transgéniques de ces gènes identifiés dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. La création du modèle double-transgénique $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ a permis d'accélérer l'apparition des lésions amyloïdes et des déficits cognitifs (Figure 13) (Jankowsky *et al.*, 2004).

En effet, les souris simple-transgéniques APP_{swe} ne développent des lésions amyloïdes qu'à partir de 24 mois d'âge, tandis que la coexpression de $PS1_{dE9}$ est à l'origine de dépôts d'A β dans le cortex et l'hippocampe dès 6 mois d'âge. La formation de plaque amyloïde s'opère jusqu'aux 12 mois d'âge du modèle (Garcia-Alloza *et al.*, 2006), avec une astrogliose se mettant en place en parallèle de ces dépôts amyloïdes, principalement dans le cortex. Entre 8 et 10 mois d'âge, des pertes neuronales peuvent être observées autour des plaques, cependant ce modèle ne présente à aucun moment de sa vie des lésions tau.

Ce modèle a déjà bien pu être caractérisé en comportement, avec des altérations des performances cognitives à partir de 12 mois (« APP_{swe}/PSEN1_{dE9} | ALZFORUM »).

Figure 13 : Caractérisation phénotypique du modèle APP_{swe}/PS1_{dE9}. D'après « APP_{swe}/PSEN1_{dE9} | ALZFORUM ».

« mo » : mois.



L'ensemble des caractérisations phénotypiques du modèle APP_{swe}/PS1_{dE9}, et sa disponibilité en élevage et en animalerie à NeuroSpin, nous a ainsi conduit à travailler sur ce modèle double transgénique.

En raison d'un nombre d'animaux restreint, les études ont été menées sur des lots d'animaux de sexes confondus. Néanmoins des différences entre mâles et femelles ont pu être rapportées dans la littérature (Ordoñez-Gutierrez *et al.*, 2016). Notamment, les mâles APP_{swe}/PS1_{dE9} développeraient plus rapidement des lésions Aβ, avec un plateau de saturation dès 9 mois d'âge, alors que les femelles atteindraient ce plateau vers 12 mois d'âge.

3. Matériel et méthodes

3.1. Animaux

3.1.1. Première cohorte

Dix-sept souris transgéniques mâles et femelles APP_{swe}XPS1_{dE9} de sexes confondus, dont 9 souris ont constitué le groupe « sham », et 8 souris le groupe traité par ultrasons, ainsi que neuf souris WT C57Bl/6 de 12 mois d'âge ont été utilisées lors de l'étude comportementale réalisée après six semaines de traitement ultrasons. Une fois l'étude comportementale achevée, les animaux ont été

euthanasiés, et l'encéphale prélevé : un hémisphère a été conservé pour mener des études histologiques, l'autre pour la réalisation de western blot pour la quantification de la charge amyloïde. Ces souris étaient issues de l'élevage situé à NeuroSpin, et étaient tous frères et sœurs de portée.

3.1.2. Deuxième cohorte

Quatre souris transgéniques mâles et femelles $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ et quatre souris WT C57Bl/6 de sexes confondus et de 9 à 10 mois ont été utilisées pour le suivi longitudinal par imagerie TEP.

Un deuxième lot de 6 souris (3 souris $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ et 3 souris WT C57Bl/6) a été utilisé comme groupe contrôle sans ultrasons, à la fin du protocole par ultrasons de 6 semaines. Ces souris étaient issues de l'élevage situé à NeuroSpin, et étaient tous frères et sœurs de portée. Une fois l'âge requis pour l'étude (9 à 10 mois), ces animaux ont été transférés à l'animalerie du SHFJ. À NeuroSpin, comme au SHFJ, les animaux étaient logés dans des cages ventilées par groupe de 2 à 4 souris, dans des conditions de 12 h de jour et 12 h de nuit. Les cages étaient enrichies par des tunnels et morceaux de papiers et étaient équipées d'un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

Un suivi de la masse corporelle a été réalisé périodiquement avant chaque session d'imagerie.

3.2. Design de l'étude

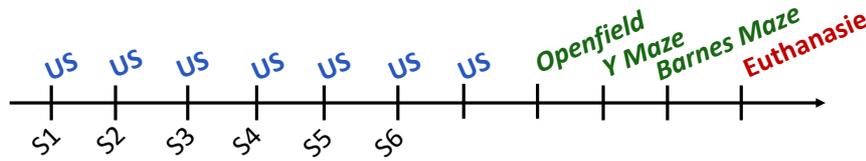
3.2.1. Étude comportementale

Les 17 souris transgéniques $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ de la première cohorte ont subi périodiquement une séance d'ultrasons transcrâniens pendant 6 semaines. Les souris $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ constituant le groupe « *sham* » ont subi le même processus (anesthésie, injection, réalisation de la trajectoire du transducteur dans le cadre motorisé) mais sans délivrance effective des ultrasons par le transducteur. Neuf souris WT C57Bl/6 ont constitué le groupe contrôle. Trois semaines après la dernière séance d'ultrasons, les trois groupes ont ensuite été soumis à trois tests comportementaux classiques : *openfield*, labyrinthe en Y, et labyrinthe de Barnes afin d'évaluer leurs performances cognitives, anxiété et locomotion (Figure 14).

Les animaux ont ensuite été euthanasiés et leur encéphale prélevé pour mener des analyses histologiques et de western blot.

Figure 14 : Protocole réalisé sur la première cohorte d'animaux.

US : Ultrasons, S : Semaine.



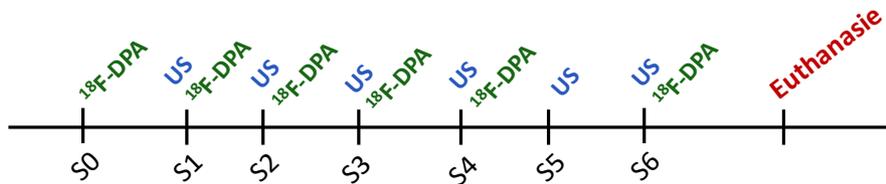
3.2.2. Investigation longitudinale de la neuro-inflammation

Quatre souris transgéniques mâles et femelles APP_{swe}xPS1_{DE9} et quatre souris WT C57Bl/6 ont subi périodiquement une séance d'ultrasons transcrâniens suivie 5 jours après d'une acquisition TEP ¹⁸F- DPA 714.

Une acquisition TEP « S0 » pour « semaine 0 » a été réalisée comme mesure basale, sans ouverture par ultrasons de la BHE. Les animaux ont ensuite été euthanasiés et leur encéphale prélevé pour mener des analyses histologiques et de western blot (Figure 15).

Figure 15 : Protocole réalisé sur la deuxième cohorte d'animaux.

US : Ultrasons, S : Semaine.



3.3. Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique

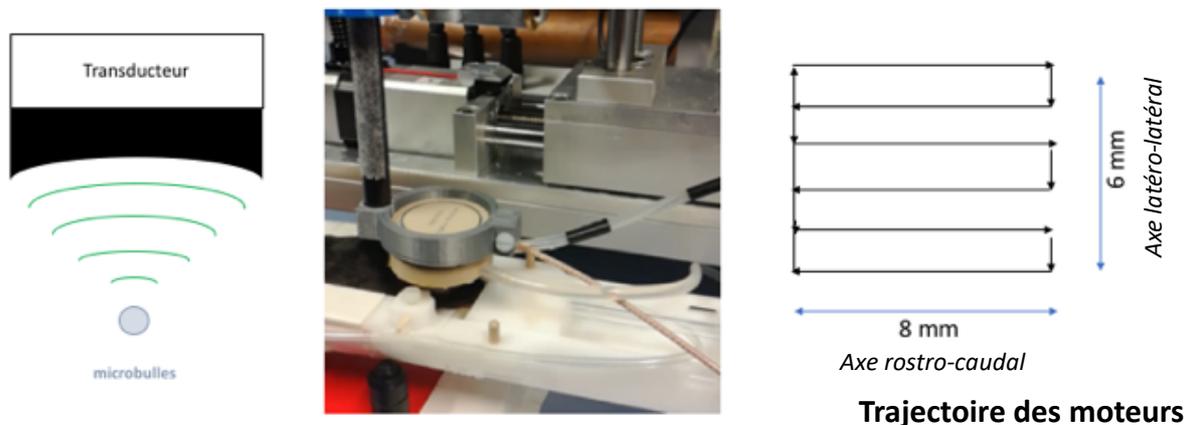
Les ultrasons transcrâniens étaient délivrés à l'aide d'un transducteur concave rempli d'eau dégazée et placé sur la tête des souris. Les souris étaient préalablement rasées et du gel à ultrasons était appliqué sur leur crâne. L'ouverture centrale du transducteur était de 25 mm. La trajectoire du transducteur était automatisée et motorisée par un système mécanique 3D déplaçant le transducteur suivant les axes x et y définis par la trajectoire du programme. La trajectoire comprenait trois allers-retours rectilignes compris sur 8 mm sur l'axe y (rostro-caudal) par 6 mm sur l'axe x (latéro-latéral), sur une durée totale de 2 min (Figure 16). Les paramètres des ultrasons délivrés étaient de P=0,6 MPa de pression de raréfaction maximale et de F=1,5 MHz de fréquence de répétition des impulsions.

Les souris étaient anesthésiées avec de l'isoflurane, rasées et placées dans le lit. Le transducteur était centré sur le crâne qui était immobilisé et 50 μ L de microbulles (SonoVue®) étaient injectés par voie intraveineuse dans le sinus rétro-orbitaire. La séquence ultrasons démarrait immédiatement après l'injection.

Pour le traitement des animaux « sham », les souris ont suivi les mêmes étapes du protocole, sans toutefois que les ultrasons soient effectivement émis.

L'efficacité et l'innocuité de ce protocole avait déjà été validées sous IRM lors d'une précédente étude (Marty *et al.*, 2012 ; Magnin *et al.*, 2015).

Figure 16 : Détails du dispositif et de la trajectoire du transducteur.

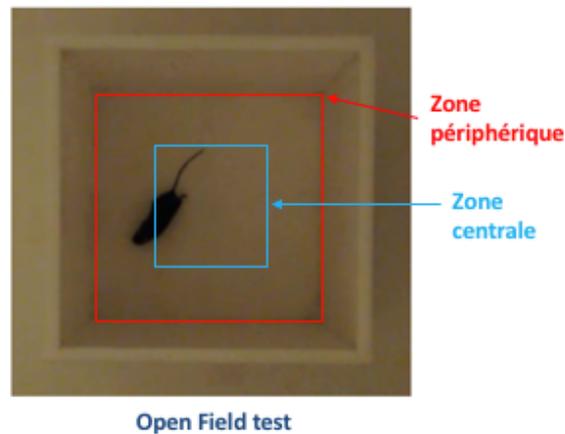


3.4. Études comportementales

3.4.1. Comportement en champ libre ou « *Openfield* »

L'activité locomotrice et l'anxiété ont été évaluées par la réalisation d'un test standard de champ libre ou plus couramment appelé « *openfield* ». L'*openfield* se composait d'une enceinte de fond blanc de 33 cm x 33 cm où étaient délimitées une zone centrale de 16,5 cm x 16,5 cm et une zone périphérique (Figure 17). Trente minutes avant la réalisation de chaque test, les cages des animaux étaient placées dans la salle de réalisation des tests comportementaux, puis chaque animal était placé au centre de l'*openfield* et l'enregistrement vidéo démarrait immédiatement. L'acquisition était réalisée durant 15 minutes.

Figure 17 : Détails du dispositif d'« openfield » pour souris présent à NeuroSpin.

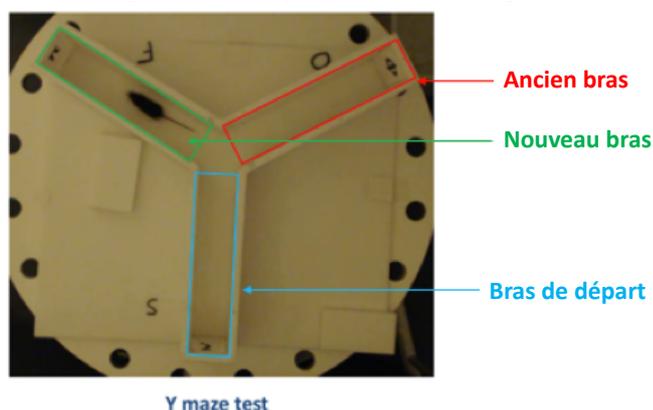


3.4.2. Comportement en labyrinthe en Y ou « Y maze »

Le labyrinthe en Y, ou test d'alternance spontanée, est un test comportemental permettant d'évaluer la mémoire spatiale ainsi que la mémoire à court terme en exploitant la tendance exploratrice naturelle des rongeurs. Le test d'alternance spontanée a été mené dans un labyrinthe en Y formé de trois bras de 8 par 40 cm (« Bras de départ », « Ancien bras », « Nouveau bras »), et des indices visuels ont été placés sur les murs (Figure 18).

Les souris étaient placées dans le bras de départ (« Bras de départ ») pendant 10 minutes durant lesquelles elles ont eu la possibilité d'explorer qu'un seul bras supplémentaire (« Ancien bras »). Elles étaient ensuite replacées dans leurs cages respectives pendant une heure. À la fin du délai, les souris étaient replacées dans le labyrinthe et le 3^{ème} bras était alors accessible (« Nouveau bras »). Les entrées successives au sein des différents bras étaient enregistrées par une caméra sur 5 minutes. Une alternance spontanée correcte est définie par l'entrée du premier bras (« Ancien bras ») suivie du deuxième bras (« Nouveau bras »).

Figure 18 : Détails du labyrinthe en Y pour souris présent à NeuroSpin.



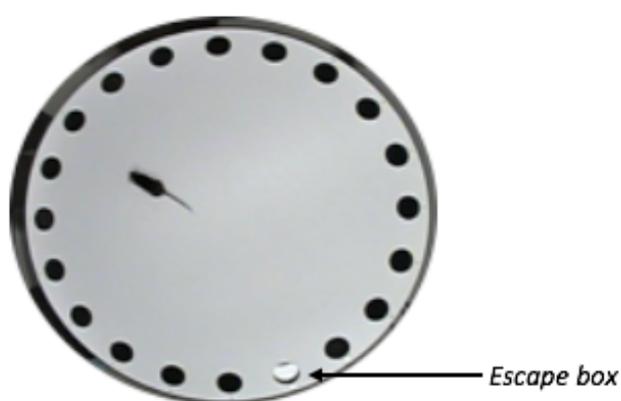
3.4.3. Comportement en Labyrinthe de Barnes ou « *Barnes maze* »

Le test du labyrinthe de Barnes est un test comportemental évaluant la mémoire et l'apprentissage spatial de référence. C'est une tâche comportementale dépendante de l'hippocampe. Le labyrinthe se composait d'une plateforme surélevée et circulaire percée de 20 trous espacés équitablement le long du périmètre du cercle (Figure 19). L'un des 20 trous disposait d'une « *escape box* » d'où l'animal pouvait se retirer et des indices visuels étaient disposés sur les murs. L'*escape box* était ensuite déplacée de 180° le premier jour du test de rétention (noté R1) afin d'évaluer l'apprentissage et la mémorisation. Le test et l'enregistrement vidéo démarraient lorsque l'animal, placé au centre du labyrinthe dans une boîte noire, était libéré et que le signal sonore et le signal lumineux étaient enclenchés. Le test prenait fin lorsque l'animal trouvait « *l'escape box* » ou après 2 minutes d'essais infructueux. L'entrée dans l'*escape box* était accompagnée de la fin du signal sonore et du signal lumineux.

L'entraînement a été réalisé deux fois par jour durant 4 jours (noté D1, D2, D3, D4) puis une fois le 5^{ème} jour (noté D5). Deux jours de pause ont séparé la phase d'entraînement de la phase de rétention. Deux tests par jours pendant 3 jours (noté R1, R2, R3) puis un test le 4^{ème} jour (noté R4) étaient ensuite réalisés pour le test de rétention. Les jours de tests D5 et R4, l'*escape box* était retirée.

Le nombre d'erreur, le temps de latence pour atteindre l'*escape box* ainsi que la distance parcourue pour l'atteindre étaient enregistrés par camera et mesurés. Les erreurs étaient définies par la recherche de l'*escape box* sous des trous qui n'en disposaient pas.

Figure 19 : Détail du labyrinthe de Barnes pour souris présent à NeuroSpin



3.5. Imagerie TEP et analyse des images

La neuro-inflammation a été évaluée par TEP par le suivi d'un radiotracer de TSPO, le ^{18}F -DPA-714, injecté dans la veine caudale via un cathéter. Les animaux étaient induits et maintenus sous anesthésie gazeuse (isoflurane, entre 1,5 et 2,5 %), et leur fréquence respiratoire était monitorée et maintenue au-dessus des 70 mpm (mouvement par minute). Un tapis chauffant était placé sous l'animal et permettait de maintenir sa température corporelle de l'animal durant l'acquisition. Les images étaient acquises lors d'une acquisition dynamique de 60 minutes sur deux machines Siemens Inveon PET et PET-CT (Siemens Medical Solutions, St Denis France). L'acquisition TEP commençait quelques secondes après l'injection du radiotracer afin de visualiser la distribution précoce.

Entre 200 et 500 μCi de ^{18}F -DPA-714 étaient injectés via un cathéter caudal pour un volume total de solution (mélange NaCl 0,9 % et éthanol) compris entre 100 et 250 μL .

Ces 60 minutes d'acquisition TEP étaient suivies par une séquence de 5 minutes de scanner X (80kV/500 μA), pour l'appareil PET-CT.

Les coordonnées spatiales et temporelles de la détection de coïncidence des photons γ antiparallèles étaient stockés en mode événementiel. Les protocoles disponibles au SHFJ appliquaient un *Fourier rebinning* et les images étaient ensuite reconstruites par l'algorithme de reconstruction 2D OSEM (taille du voxel : 0,4 mm x 0,4 mm x 0,8 mm) et permettaient d'obtenir une résolution de 1,5 mm.

Les images dynamiques TEP obtenues étaient réalignées pour corriger les déplacements possibles entre les images TEP et CT (scanner X) et recalées sur un atlas IRM de souris afin de délimiter les régions d'intérêt (ou ROIs), à l'aide du logiciel PMOD®, version 3.7, Technologies Ltd. Étant donné la résolution des acquisitions TEP et des dimensions du cerveau murin, trois principales ROIs ont été définies : le cortex et les deux hippocampes, le cervelet, et les régions subcorticales (autres régions du SNC murin, excluant le cortex, les hippocampes et le cervelet). Sur les 60 minutes d'acquisition dynamique, les valeurs de radioactivité enregistrées (en Bq/cc) des 30 dernières minutes de la courbe de radioactivité (plateau d'équilibre reflétant la fixation spécifique du DPA-714), ont été corrigées par rapport à la dose radioactive effectivement injectée (% ID/cc *percent injected dose per cubic centimeter*) et normalisées par rapport au cervelet. La fixation du ^{18}F -DPA-714 était alors exprimée en valeurs NUV_{cb} (*Normalized to the cerebellum uptake values*).

Comme la protéine TSPO est présente dans toutes les structures cérébrales, aucune vraie région cérébrale de référence n'a pu être identifiée. Une alternative acceptable est l'utilisation du cervelet comme pseudo-région de référence. En effet, dans la maladie d'Alzheimer, le cervelet ne présente ni lésions tau, ni lésions amyloïdes (ou du moins que dans les phases terminales), et cette pseudo-

référence a déjà pu être validée dans d'une précédente étude, (Chaney *et al.*, 2018). Au cours de notre étude, les ultrasons n'ont de plus pas été émis dans le cervelet des souris traitées.

Afin d'évaluer la neuro-inflammation induite au cours des séances d'ultrasons, la fixation du ^{18}F -DPA-714, radioligand spécifique de TSPO a été suivi par imagerie TEP lors d'une acquisition dynamique d'une durée de 60 minutes. Cette acquisition a été réalisée sur l'ensemble des huit animaux toutes les semaines pendant 6 semaines, et 5 jours après l'ouverture de la BHE par ultrasons.

L'acquisition dynamique de 60 minutes était laborieuse pour un animal de petite taille comme la souris, en particulier pour la pose du cathéter dans la veine caudale, le temps long d'acquisition de donc d'anesthésie majorant le risque de mortalité pour ces animaux de petite taille à haut métabolisme, et pour le nombre limité de souris qu'il était possible d'imager par jour.

Elle permettait cependant d'obtenir une quantification de la fixation du radiotracer pour n'importe quel intervalle de temps souhaité. Dans notre étude, seules les 30 dernières minutes, période pendant laquelle le signal est le plus stable et reflétant la fixation spécifique du ^{18}F -DPA-714, ont ainsi été analysées.

Comme le temps de demi-vie du ^{18}F est de 110 minutes, et la durée de l'examen d'au minimum 65 minutes (60 minutes d'acquisition TEP et 5 minutes de scanner X), la dose radioactive injectée était faible au-delà du quatrième animal (cela dépendait également de la qualité de la radiosynthèse effectuée le matin des examens). Une dose radioactive trop faible diminuait la qualité des images, ou bien conduisait à l'augmentation du volume total de solution injecté pour parvenir à une même dose radioactive. Ce dernier point était délicat, car plus la radioactivité avait décréu, plus le volume total ainsi que la proportion d'éthanol dans la solution, devaient être importants pour injecter une dose radioactive suffisante, et le volume total d'injection possible dans cette espèce était ainsi rapidement atteint. Nous avons donc réalisé au maximum quatre examens successifs par jour pour nous affranchir de ces problèmes. Comme le SHFJ dispose de deux appareils TEP, il a été possible d'augmenter ce nombre par la réalisation de deux examens TEP simultanés, nous autorisant ainsi l'acquisition TEP de huit animaux par jour.

Afin d'obtenir une quantification fidèle de la fixation du ^{18}F -DPA-714, la correction du temps mort, de la dose injectée dans chaque animal et de la décroissance est nécessaire et a été réalisée par le chronométrage et la prise des temps à la préparation de la seringue contenant la dose radioactive, à l'injection de la dose, et par la mesure de l'activité à chacun de ces temps. L'activité résiduelle de la seringue vide après injection, ainsi que la prise de temps ont également été réalisés afin de soustraire cette activité à la dose réelle injectée.

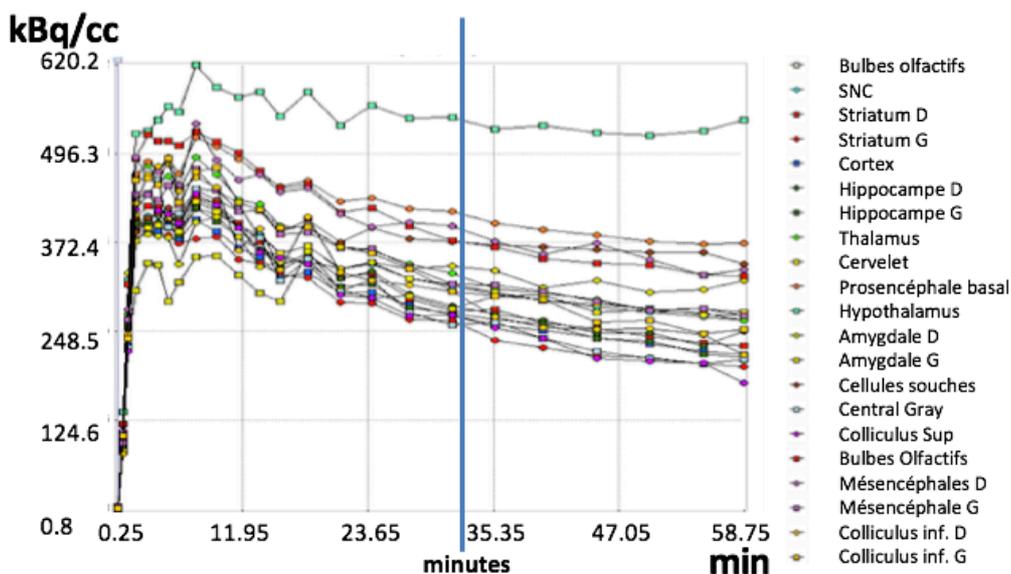
La correction du volume partiel n'était pas obligatoire, car sa prise en compte peut juxtaposer d'autres effets indésirables sur la qualité de la quantification, ainsi nous n'avons pas réalisé cette correction dans notre étude.

Pour localiser anatomiquement la fixation du ¹⁸F-DPA-714, le traitement des images a été réalisé en utilisant le logiciel PMOD®. Dans cette étude, le recalage de l'image TEP a d'abord été réalisé sur l'image anatomique obtenue par le scanner X acquis à la fin de chaque séquence TEP. Enfin, cette image a ensuite été recalée sur un atlas IRM anatomique « *Mouse Mirrione* » disponible dans le logiciel PMOD® (*Ma-Benveniste-Mirrione*). Cet atlas IRM correspond à la déformation minimale de séquences IRM T2-weighted de 10 souris mâles C57Bl/6J de 12 à 14 semaines d'âge et de 25 à 30g.

L'ensemble de ces deux transformations (image TEP sur scanner et scanner sur IRM) permet de superposer les images TEP à l'atlas IRM et de définir des régions d'intérêt (ROIs) : cortex, hippocampe, thalamus, bulbes olfactifs, etc. L'image obtenue permet ainsi d'obtenir la fixation du ¹⁸F-DPA-714 dans chaque ROI, moyennée et intégrée sur 60 minutes.

L'application de ces ROIs sur les images TEP permettait finalement de lancer les calculs statistiques et de générer des courbes temps-activité pour chaque image acquise et pour chaque ROI dont les valeurs étaient exprimées en kBq/cc. Un exemple de courbe d'activité issues du logiciel PMOD® est illustré dans la figure 20.

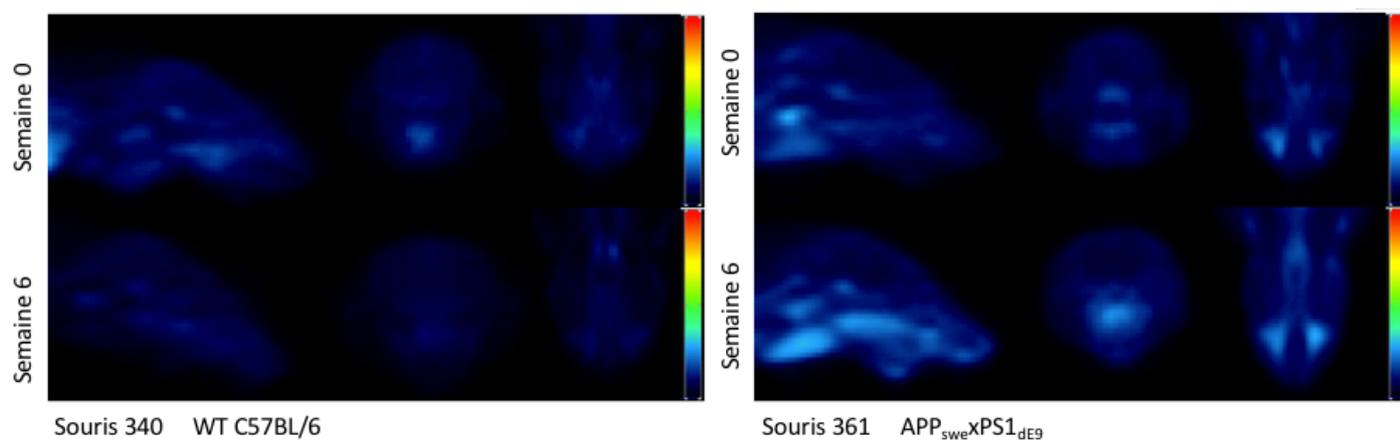
Figure 20 : Courbe temps-activité obtenue par traitement des images obtenues par tomographie par émission de positons.



L'application de ces ROIs, ainsi que les corrections effectuées ont permis d'exprimer un % ID/cc (pourcentage de dose injectée par centimètre cube) dans chaque ROI sur les 30 dernières minutes d'acquisition TEP. Les % ID/cc des ROIs ont ensuite été normalisés par rapport au % ID/cc du cervelet pour obtenir des valeurs NUV_{cb} (*Normalized uptake values*) correspondant à la dose radioactive corrigée par rapport à la dose radioactive effectivement injectée et normalisée par rapport au cervelet.

Un exemple des images obtenues par TEP est présenté dans la figure 21.

Figure 21 : Images obtenues par Tomographie par Émission de Positons : fixation du ^{18}F -DPA-714 exprimée en Bq/cc.



En raison de la faible résolution des images TEP, des dimensions du cerveau murin, et du recalage manuel, pouvant être à l'origine d'une superposition et d'un recalage imprécis des ROIs, ces données NUV_{cb} ont été comparées dans deux grandes ROIs : l'ensemble cortex et hippocampes et les régions subcorticales.

Pour la quantification du signal TSPO chez la souris, la quantification par l'obtention du % ID/cc était une méthode acceptable nous permettant de nous affranchir de la réalisation d'une fonction d'entrée. En effet, il est quasi-impossible de réaliser une fonction d'entrée et les prélèvements de sang artériel nécessaires chez la souris en raison de son faible volume sanguin total.

3.6. Euthanasie et prélèvement des encéphales

À la fin des protocoles, l'ensemble des souris ont été anesthésiées sous kétamine 100 mg/kg – xylazine 10 mg/kg en intrapéritonéale, puis perfusées en sérum physiologique NaCl 0,9 %. Les encéphales ont été disséqués de la boîte crânienne puis séparés en deux au niveau de la scissure

interhémisphérique. Les hémisphères ont ensuite été plongés dans l'isopentane et dans l'azote liquide puis congelés à -80°C.

3.7. Analyse statistique

Les données comportementales ont été analysées par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour le test d'*openfield* et du labyrinthe de Barnes, par analyse de la variance à deux facteurs (*two-ways ANOVA*) pour le test du labyrinthe de Barnes, par un test de Tukey *post hoc* pour le test du labyrinthe de Barnes et par un T-test pour le labyrinthe en Y. Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R® et les valeurs obtenues dans les tests comportementaux étaient exprimées en moyenne +/- l'erreur type de la moyenne (SEM). Dans cette étude, et pour le test du labyrinthe de Barnes en particulier, nous n'avons pas appliqué d'ajustement du seuil de significativité par la méthode de Bonferroni.

Les données TEP obtenues ont été analysées par un T-test à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Les données d'imagerie TEP étaient exprimées en moyenne +/- l'écart type (SD).

4. Présentation et Analyse des résultats

4.1. Étude préliminaire : comportement

Afin de mettre en évidence une action thérapeutique des ultrasons transcrâniens sur les fonctions mnésiques, des tests comportementaux ont été réalisés (*openfield*, labyrinthe en Y et labyrinthe de Barnes), sur trois groupes de souris (*APP_{swe}/PS1_{DE9}* traitées par ultrasons et notées AD US, *APP_{swe}/PS1_{DE9} sham* non traitées par ultrasons et notées AD, et WT non traitées par ultrasons). Une restauration des fonctions mnésiques après 6 semaines de séances d'ultrasons a précédemment été montrée chez le modèle souris APP23 de la maladie d'Alzheimer par les tests de reconnaissance d'objets nouveaux, d'évitement actif et de labyrinthe en Y (Leinenga et Götz, 2015).

Dix-sept souris transgéniques *APP_{swe}/PS1_{DE9}* (9 *sham* et 8 traitées par ultrasons) et 9 souris WT ont ainsi été soumises à 6 semaines d'ultrasons suivies des tests comportementaux. Ces tests comportementaux ont été réalisés avec Matthieu Gerstenmayer et Erwan Selingue.

La réalisation de tests comportementaux et l'obtention de résultats francs sont complexes. Ainsi, en ce qui concerne certains résultats obtenus dans cette étude comportementale, à défaut de pouvoir parler de différences significatives, nous parlerons plutôt de tendance comportementale.

4.1.1. Comportement en champ libre ou « *openfield* »

Les données obtenues en *openfield* montrent que les souris $APP_{swe}/PS1_{dE9}$ étaient plus actives que leurs frères et sœurs de portée WT, ainsi une augmentation significative de la distance totale parcourue dans l'*openfield* a pu être mise en évidence entre les souris AD et WT ($p=0,008$, test de Wilcoxon) et entre les souris AD US et WT ($p=0,046$, test de Wilcoxon) (Figure 22). Aucune différence significative n'a pu être montrée entre les souris AD et AD US ($p=0,87$, Test de Wilcoxon). Une telle observation en *openfield* avait déjà été précédemment décrite au sein du modèle $APP/PS1$ (Hooijmans *et al.*, 2009).

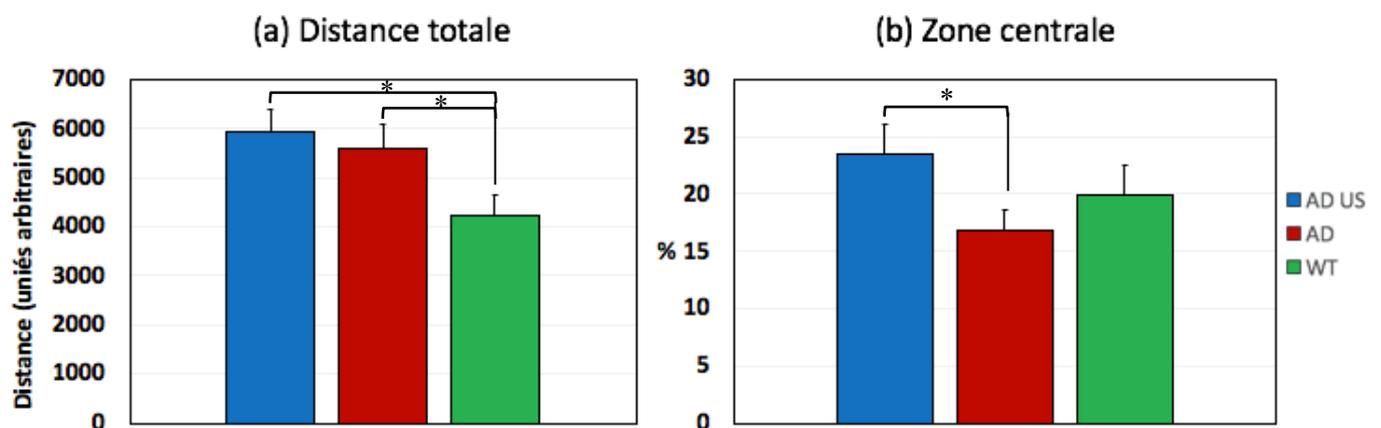
Ces premières données obtenues en *openfield* nous permettaient de plus de vérifier que les séances d'ultrasons n'avaient pas altéré la locomotion des animaux, ce qui était une composante importante à vérifier avant de pouvoir interpréter les données comportementales obtenues ultérieurement.

En ce qui concerne l'évaluation de l'anxiété, la proportion de distance parcourue dans la zone centrale était significativement augmentée chez les souris AD US par rapport aux souris AD ($p=0,047$, test de Wilcoxon) suggérant que les traitements par ultrasons diminuaient l'anxiété des souris Alzheimer, un des symptômes précoces de la maladie d'Alzheimer.

Figure 22 : Résultats comportementaux obtenus en « *openfield* ».

(a) Distance totale parcourue en *openfield*. (b) Proportion de la distance parcourue dans la zone centrale.

AD US : Souris $APP/PS1$ traitées par ultrasons, $n=8$. **AD** : Souris $APP/PS1$ non traitées par ultrasons, $n=9$. **WT** : Souris WT non traitées par ultrasons, $n=9$.



4.1.2. Labyrinthe en Y

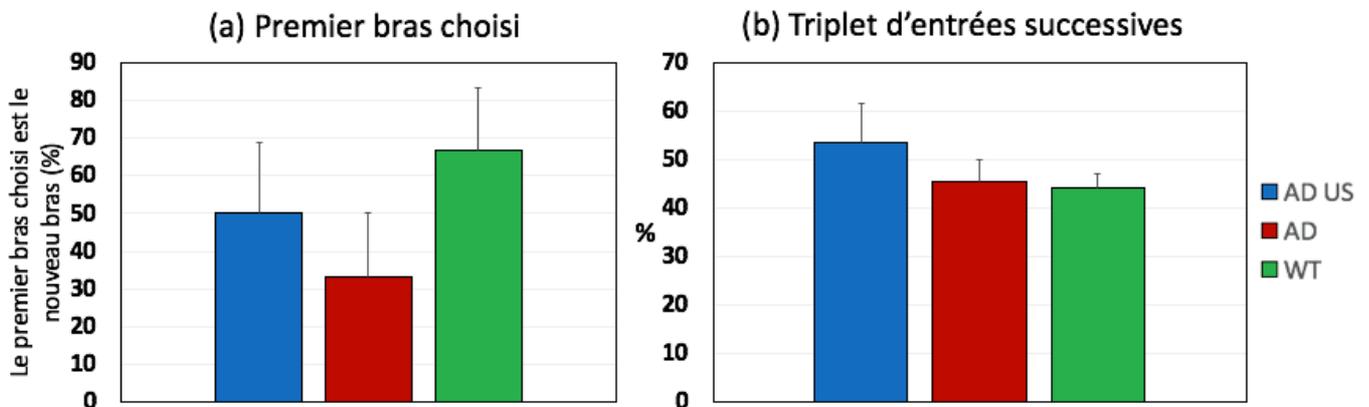
Les données comportementales obtenues dans le labyrinthe en Y n'ont pu montrer ni différence significative, ni tendance comportementale. Bien que l'on puisse noter une augmentation du pourcentage de succès (le premier bras choisi était le nouveau bras) chez les souris AD US par rapport aux souris AD, cette différence n'était pas significative ($p=0,64$, T-test) (Figure 23).

L'indice « Triplet d'entrées successives » ne montrait ni différence statistique, ni tendance comportementale. De plus, cet indice ne semblait pas être adéquat pour notre étude puisque celui-ci ne permettait pas de distinguer les souris AD des souris WT.

Figure 23 : Résultats comportementaux obtenus dans le labyrinthe en Y.

(a) Pourcentage de succès : le premier bras choisi est le nouveau bras (b) Triplet d'entrées successives dans chacun des trois bras sans chevauchement, normalisé sur le nombre de bras visités.

AD US : Souris APP/PS1 traitées par ultrasons, $n=8$. **AD** : Souris APP/PS1 non traitées par ultrasons, $n=9$. **WT** : Souris WT non traitées par ultrasons, $n=9$.



Ces résultats obtenus dans le labyrinthe en Y étaient plus délicats à interpréter, et aucune donnée significative obtenue dans ce test ne permettait de conclure franchement que les souris AD US présentaient de meilleures performances cognitives et une amélioration de leur mémoire par rapport aux souris AD.

4.1.3. Labyrinthe de Barnes

Les données obtenues dans le labyrinthe de Barnes durant la phase d'entraînement (au cours des cinq premiers jours, notés D1 à D5) n'ont pas démontré d'effet significatif de l'apprentissage sur le nombre d'erreur effectué (Figure 24). Ainsi, que ce soit pour les souris AD US, AD et même chez les souris WT, aucune amélioration dans le nombre d'erreurs effectuées ne pouvait être révélé au cours des 5 jours d'apprentissage.

Malgré cette absence d'apprentissage de la tâche durant la phase d'entraînement, un réapprentissage des souris a pu être mis en évidence lors de la phase de rétention, lorsque la plateforme était tournée de 180°. En effet, du jour 1 au jour 4 du test de rétention (notés R1 et R4), les souris AD US diminuaient significativement leur nombre d'erreurs ($p=0,00008$, *two-ways ANOVA*), suggérant qu'elles réapprenaient correctement la tâche au cours des jours.

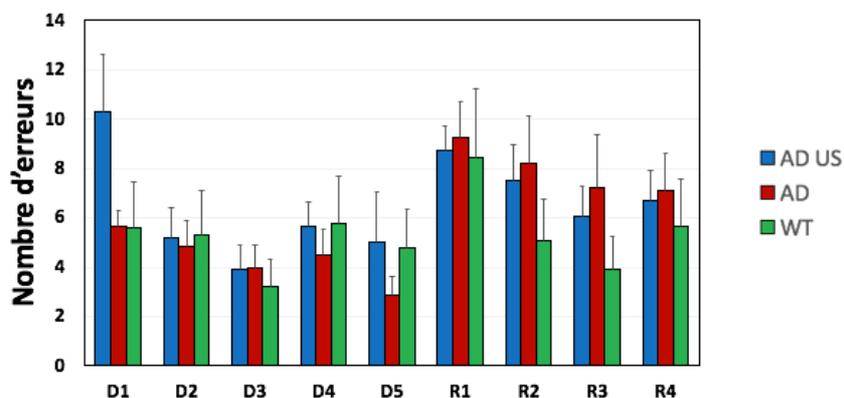
Bien que non significative, l'ensemble des souris (AD US, AD et WT) présentaient également cette même tendance ($p=0,07$, *two-ways ANOVA*), montrant que quelque soit le groupe de souris, elles réapprenaient la tâche durant la phase de rétention.

De façon plus intéressante, en comparant la progression des animaux du jour R1 au jour R4, on pouvait noter une tendance à la diminution du nombre d'erreurs effectuées ($p=0,08$, Tukey *post-hoc test*) chez les souris AD US par rapport aux souris AD, suggérant que les souris AD US réapprenaient mieux que leurs congénères AD non traités par ultrasons. De plus, aucune tendance ou différence significative dans le réapprentissage du jour R1 au jour R4 n'a pu être mise en évidence entre les souris AD US et WT ($p=0,68$, Tukey *post-hoc test*), ce qui pourrait suggérer que le traitement par ultrasons des souris AD US leur avait permis de retourner à une capacité d'apprentissage équivalente aux WT.

Figure 24 : Résultats comportementaux obtenus en labyrinthe de Barnes : nombre d'erreurs effectuées pour trouver « l'escape box ».

AD US : Souris APP/PS1 traitées par ultrasons, n=8. **AD** : Souris APP/PS1 non traitées par ultrasons, n=9. **WT** : Souris WT non traitées par ultrasons, n=9.

D : jour du test de la phase d'apprentissage. **R** : jour du test de la phase de rétention.

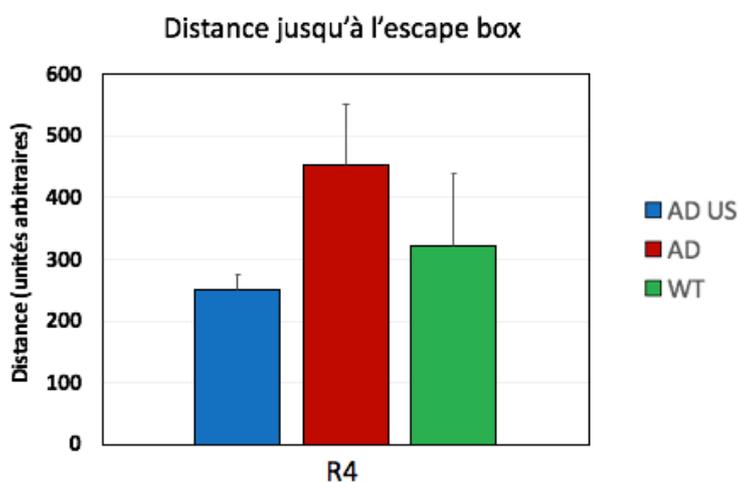


Enfin, le dernier jour du test de rétention (noté R4), on pouvait observer que les souris AD US avaient tendance à se diriger plus directement vers l'escape box que les souris AD (p=0,08, test de Wilcoxon) (Figure 25). Cela suggérerait que les souris traitées par ultrasons présenteraient une amélioration de leurs fonctions mnésiques, ou du moins réapprendraient mieux que les souris AD.

Figure 25 : Résultats comportementaux obtenus en labyrinthe de Barnes : distance parcourue jusqu'à « l'escape box », le dernier jour du test de rétention R4.

AD US : Souris APP/PS1 traitées par ultrasons, n=8. **AD** : Souris APP/PS1 non traitées par ultrasons, n=8. **WT** : Souris WT non traitées par ultrasons, n=9.

D : jour du test de la phase d'apprentissage. **R** : jour du test de la phase de rétention.



Ces dernières données comportementales n'ayant pas montré de différences significatives, ces observations pourraient être le reflet d'une réelle tendance de restauration des capacités cognitives induite par les ultrasons, mais ne peuvent être inférées à ce stade quant à l'effet thérapeutique des ultrasons sur les performances mnésiques des souris modèles de la maladie d'Alzheimer.

4.2. Fixation du ^{18}F -DPA-714

Peu de différences notables ont été observées dans le signal de TSPO entre deux séances d'ultrasons. Les valeurs NUV_{cb} sont présentées dans les figures 26 et 27, à l'ouverture du protocole par ultrasons (notée « S0 » pour « semaine 0 ») et à la fin des six semaines d'ultrasons (notée « S6 » pour « semaine 6 »). L'ensemble des valeurs NUV_{cb} de l'intégralité du protocole et pour chaque semaine est présenté en annexes 1 à 2.

Une première observation des valeurs NUV_{cb} ne montrait pas d'effet du génotype sur la fixation du ^{18}F -DPA-714, ainsi les NUV_{cb} des souris WT étaient sensiblement les mêmes que celles des souris transgéniques, suggérant que dans ce modèle de la maladie d'Alzheimer et à cet âge (9-10 mois), l'état neuro-inflammatoire ne présentait pas de différences objectivables par suivi de TSPO par imagerie TEP. De telles observations ont déjà été faites dans ce modèle à 6 et 12 mois d'âge (Chaney *et al.*, 2018).

La comparaison des valeurs NUV_{cb} avant le début des ultrasons (« semaine 0 ») aux valeurs obtenues à la fin du protocole (« semaine 6 ») permettait de mettre en évidence une augmentation significative du signal de TSPO dans le cortex et les hippocampes chez les souris AD US ($p=0,03$, T-test). Une tendance identique, mais non significative ($p=0,07$, T-test) était également observable chez les souris AD US dans les régions subcorticales.

En ce qui concerne les souris WT traitées par ultrasons (notées WT US), aucune tendance ou différence significative n'a pu être mise en évidence entre le début et la fin du protocole avec ultrasons, que ce soit dans le cortex et les hippocampes ou les régions subcorticales.

Un effet non pris en compte dans cette analyse reste la part d'augmentation du signal de TSPO imputable au vieillissement de la souris qui s'opère dans les six semaines d'intervalle entre le début et la fin du protocole par ultrasons. En effet, une précédente étude avait pu montrer un effet significatif de l'âge sur la fixation du ^{18}F -DPA-714, avec une augmentation significative du signal de TSPO entre les souris *APP/PS1* âgées de 6 mois et les souris *APP/PS1* âgées de 18 mois, à la fois dans le cortex et les hippocampes ainsi que dans les régions subcorticales (Chaney *et al.*, 2018). Ces résultats permettaient de suggérer un effet de l'âge sur le niveau de neuro-inflammation détectable par imagerie TEP de la protéine TSPO chez la souris *APP/PS1* et nous nous sommes ainsi interrogés sur la part d'augmentation du signal TSPO imputable au vieillissement des souris durant ces six semaines. Cependant, dans cette même étude, aucune différence significative n'avait pu être mise en évidence dans la fixation du ^{18}F -DPA-714 durant 6 mois de vieillissement chez les souris *APP/PS1* âgées de 6 mois et les souris *APP/PS1* âgées de 12 mois ainsi que chez les souris *APP/PS1* âgées de 12 mois et les souris *APP/PS1* âgées de 18 mois, ce qui tendrait à faire penser qu'il ne devrait pas y avoir d'effet du vieillissement en 6 semaines de protocole dans cette tranche d'âge.

Afin de faire la part entre l'effet neuro-inflammatoire induit par les ultrasons et l'effet neuro-inflammatoire simplement dû à l'âge, nous avons également constitué un groupe de souris *APP/PS1* et WT du même âge, n'ayant pas suivi le protocole de traitement par ultrasons, et pour lequel nous avons réalisé en parallèle une séquence d'acquisition TEP à la fin des six semaines de notre étude (Figures 26 et 27).

La quantification du ^{18}F -DPA-714 dans ce groupe contrôle non traité par ultrasons n'a révélé aucune tendance ou différence significative entre les souris AD US à la semaine 0 (avant l'ouverture du protocole de traitement par ultrasons) et les souris non traitées par ultrasons à la semaine 6 (notées AD NON US), ce qui suggérerait que l'augmentation significative de la fixation du ^{18}F -DPA-714 chez les souris AD US serait bien due au traitement par ultrasons de ces souris ; ceci à la fois dans le cortex et les hippocampes ($p=0,22$, T-test) ainsi que dans les régions subcorticales ($p=0,23$, T-test).

Figure 26: Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 (a) dans le cortex et l'hippocampe (b) dans les régions subcorticales, exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).

AD US : souris APP/PS1 traitées par ultrasons, $n=4$. **AD NON US** : souris APP/PS1 non traitées par ultrasons, $n=3$. **S** : semaine.

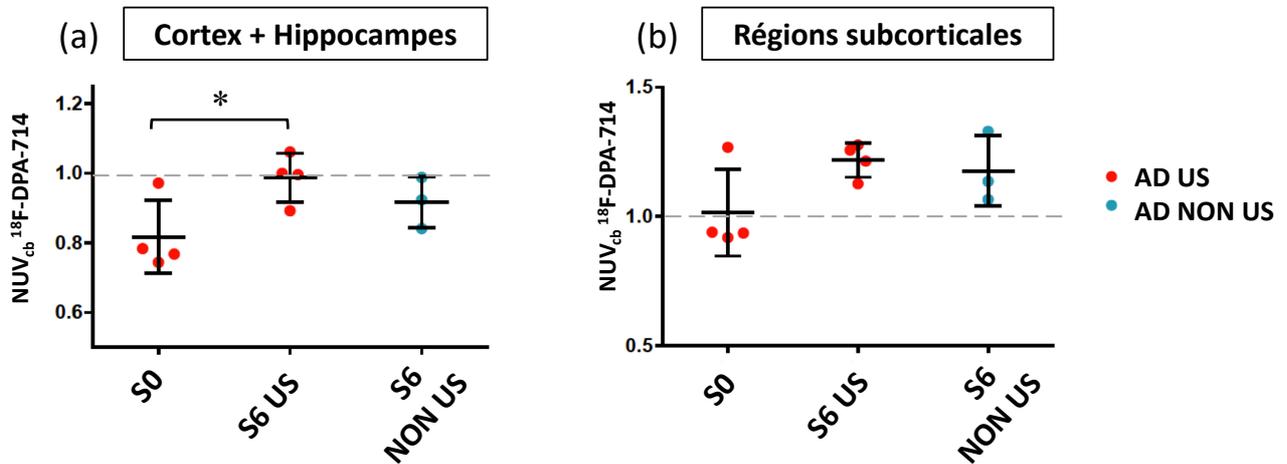
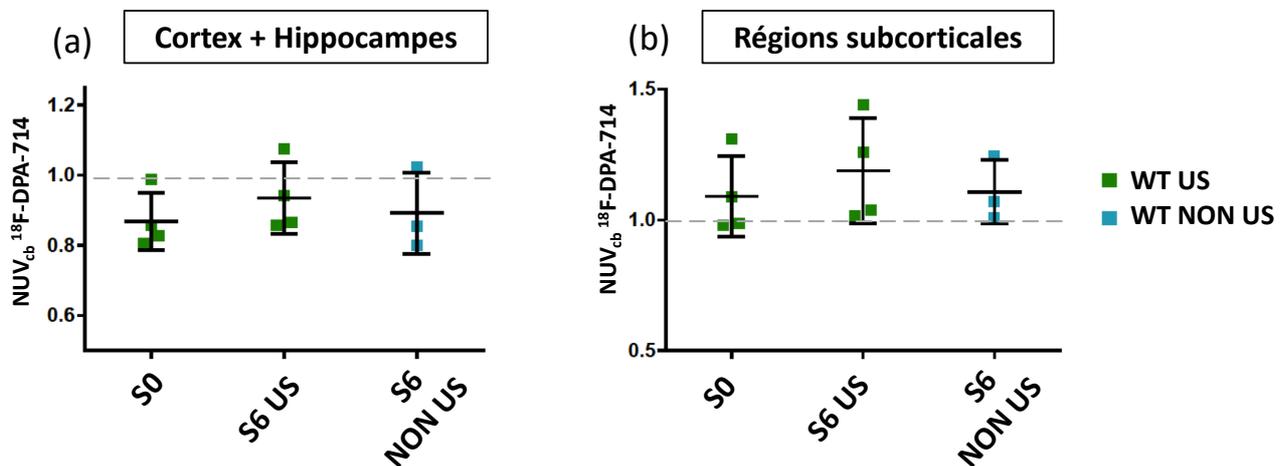


Figure 27 : Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 (a) dans le cortex et l'hippocampe (b) dans les régions subcorticales, exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).

WT US : souris WT traitées par ultrasons, $n=4$. **WT NON US** : souris WT non traitées par ultrasons, $n=3$. **S** : semaine.



Au bout de six semaines, et potentiellement indépendamment du vieillissement des souris qui s'opérait dans cet intervalle, les ultrasons ont été spécifiquement à l'origine d'une augmentation du signal de TSPO et donc de la neuro-inflammation chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Cette augmentation de la neuro-inflammation est d'autant plus intéressante qu'elle n'était significative que dans le cortex et les hippocampes, régions les plus affectées dans la maladie d'Alzheimer par les

plaques amyloïdes. En effet, on ne retrouvait pas de différences significatives suite au traitement par les ultrasons dans les régions subcorticales, chez les souris *APP_{swe}/PS1_{dE9}*.

La réalisation d'un protocole de traitement par ultrasons par délivrance périodique sur une période de six semaines a donc induit un état neuro-inflammatoire détectable par imagerie TEP de la protéine TSPO chez la souris modèle de la maladie d'Alzheimer.

Cette première étude longitudinale combinant l'imagerie TEP de la TSPO et les ultrasons nous a ainsi permis de valider la faisabilité de l'utilisation de l'imagerie TEP de la TSPO pour la détection *in vivo* des phénomènes neuro-inflammatoires induits par les ultrasons.

Ces résultats ne nous permettaient cependant pas de conclure que cet état neuro-inflammatoire induit par les ultrasons chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer était protecteur et était à l'origine d'une clairance amyloïde. La réalisation de la charge amyloïde par western blot nous permettra peut-être de répondre ultérieurement à cette question.

5. Perspectives

5.1. Quantification de la charge amyloïde et résultats espérés

5.1.1. Objectifs et résultats espérés

La quantification de la charge amyloïde des cerveaux (télencéphale) des souris modèles de la maladie d'Alzheimer traitées par ultrasons versus non traitées par ultrasons, est l'un des objectifs de ce projet.

Ainsi la quantification de la charge amyloïde a été réalisée par western blot après extraction des protéines de l'hémisphère droit des souris étudiées. La révélation de la bande à 4-6 kDa du peptide A β est complexe en raison de sa petite taille et une deuxième membrane doit être utilisée lors du transfert afin de pouvoir visualiser la bande correspondante.

Malheureusement, au jour de ce manuscrit, la mise au point d'un protocole de western blot optimal permettant de visualiser les bandes correspondant au peptide A β et de ses oligomères n'est pas encore réalisée. Notamment, la deuxième membrane nécessite des conditions de transfert particulières en cours de finalisation.

Ces résultats ont pour objectif de démontrer et de quantifier l'effet thérapeutique des ultrasons, par la mise en évidence d'une diminution de la charge amyloïde chez les souris modèles de la maladie

d'Alzheimer traitées par ultrasons versus les souris Alzheimer non traitées. Cela a déjà pu être mis en évidence dans une précédente publication, (Leinenga et Götz, 2015).

5.1.2. Matériel et méthodes

5.1.2.1. Extraction des protéines

Afin de réaliser la quantification des peptides A β , nous avons réalisé deux séries d'extraction de protéines des cerveaux dans le but d'obtenir deux fractions : l'une enrichie en protéines extracellulaires et l'autre en protéines intracellulaires.

L'hémisphère droit des souris a été placé dans 4 volumes de tampon contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 0,01 % NP-40, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 0,1 % SDS (dodécylsulfate de sodium), 1 mM PMSF (fluorure de phénylméthanesulfonyl) et des antiprotéases (complete protease inhibitors, Roche). Le tissu cérébral a été dissocié par homogénéisation douce à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 19 gauge en effectuant 10 aspirations-refoulements. La solution a ensuite été centrifugée à 800 g pendant 10 min, donnant un surnageant enrichi en protéines extracellulaires. Le culot a été conservé et remis en suspension dans 4 volumes de 50 mM tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl et 1 % de Triton X-100 puis centrifugé à 16 000 g pendant 90 min donnant un surnageant enrichi en protéines intracellulaires.

Toutes les étapes d'extraction ont été réalisées à 4°C et les échantillons conservés à -20°C ou à -80°C pour une utilisation plus tardive.

La concentration en protéines totales a ensuite été déterminée par un dosage BCA (*Bicinchoninic acid Assay*) de Pierce.

5.2.1.2. Western blotting

Trente-trois microgrammes de protéines totales de la fraction extracellulaire et 20 μ g de protéines totales de la fraction intracellulaire ont été déposés dans chaque puits d'un gel Tris-Glycine 10-20 % de chez Bio-Rad, et transférées sur des membranes de PVDF (Polyfluorure de vinylidène) de 0,45 μ m, dans le tampon de transfert Bio-Rad Tris-Glycine. Une deuxième membrane a été utilisée afin de capturer le monomère A β (entre 4 et 6 kDa).

Afin de visualiser les différentes espèces A β les membranes ont été incubées toute la nuit avec l'anticorps souris anti-amyloïde β , clone W0-2, à la concentration 0,5 μ g/mL pour 10 μ g de protéines totales. Pour la révélation visuelle, l'anticorps secondaire utilisé était un anticorps d'âne anti-souris préparé à la dilution 1 :1000, et révélé par impression sur un film photographique. Un anticorps lapin

anti-GAPDH est utilisé comme contrôle, à la dilution 1 :1000 également révélé par un anticorps secondaire d'âne anti-lapin préparé à la dilution 1 :1000.

Le film photographique imprimé était ensuite analysé par densitométrie par l'utilisation du logiciel ImageJ® pour la quantification des différentes espèces A β .

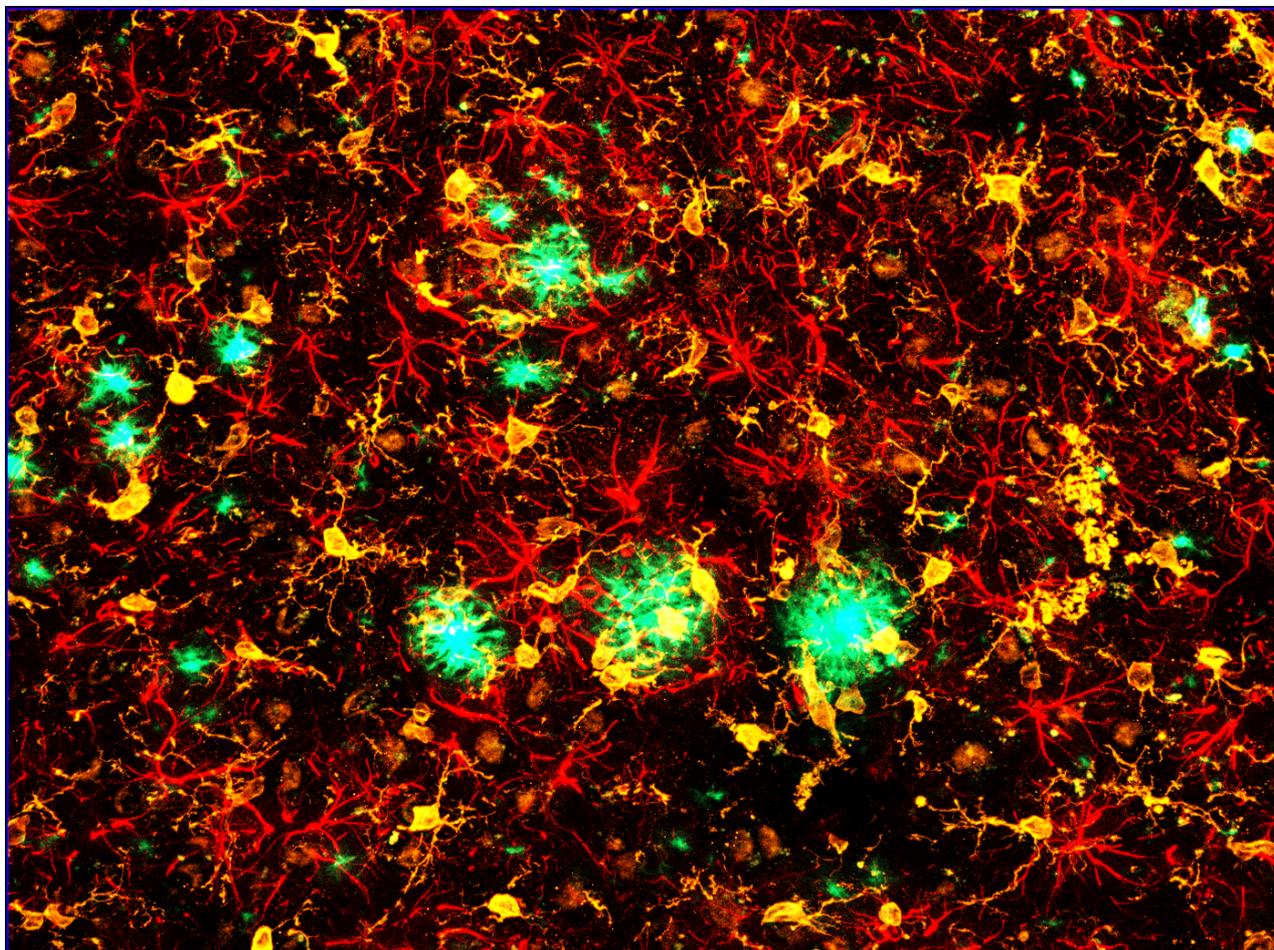
5.2. Autoradiographie et immunohistochimie

Il serait intéressant de mener deux autres études expérimentales, sur les hémisphères des cerveaux des souris euthanasiées durant ce projet : l'autoradiographie ainsi que l'immunohistologie. En effet, l'autoradiographie est une technique expérimentale réalisée sur des coupes histologiques *ex vivo* permettant le marquage et la détection d'un radioligand spécifique d'une cible donnée. La réalisation d'autoradiographie de TSPO sur les mêmes cerveaux ayant subi les protocoles ultrasons et TEP permettrait de confirmer la distribution du radioligand de TSPO.

De plus, la réalisation d'une immunohistochimie, sur des coupes adjacentes à celles réalisées pour l'autoradiographie permettrait de mettre en évidence une éventuelle co-localisation entre la TSPO et des marqueurs gliaux spécifiques : Iba1 pour la microglie, GFAP pour les astrocytes, ainsi que des marqueurs de l'amyloïde comme la thioflavine (Figure 28).

Ainsi la réalisation de ces techniques *ex vivo* en complément de l'étude TEP *in vivo* permettrait de valider dans ce modèle animal, la spécificité du radioligand de TSPO pour l'activation microgliale, et de confirmer les hypothèses d'une neuro-inflammation thérapeutique induite par les ultrasons.

Figure 28 : Immunohistochimie réalisée à NeuroSpin au cours de cette étude (Françoise Geffroy). Coupe coronale d'encéphale de rat TgF344 modèle de la maladie d'Alzheimer (également double transgénique APP/PS1). En vert, le marquage thioflavine des plaques amyloïdes, en jaune, le marquage Iba1 de la microglie, en rouge, le marquage GFAP des astrocytes.



6. Discussion

Les études comportementales menées sur les souris traitées par ultrasons se sont révélées être difficilement interprétables, du fait d'un défaut de différences significatives entre les souris AD US, AD et WT et ne nous ont pas permis de conclure quant à l'effet thérapeutique des ultrasons sur les capacités cognitives. Le choix des tests comportementaux réalisés, ainsi que leurs conditions de réalisation pourraient être à l'origine d'un manque de discrimination clinique. De plus, les groupes étaient constitués de mâles et de femelles, ce qui pourrait peut-être diminuer la capacité de détection d'une différence significative entre les groupes, s'il existait bien une différence réelle. Cependant, bien que l'affection amyloïde évolue selon une chronologie différente chez les mâles et les femelles (plateau

de saturation amyloïde à 9 mois chez les mâles contre 12 mois chez les femelles), ces différences intersexuelles n'auraient pas dû avoir d'influence, puisque les animaux étaient âgés de plus de 12 mois au démarrage du protocole, soit au-dessus du plateau de saturation de l'affection amyloïde aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

Pour le protocole avec ultrasons, une hétérogénéité inévitable est à prendre en compte du fait même de sa mise en pratique : le placement du transducteur, le point de focalisation, les variabilités interindividuelles du crâne des souris, *etc.* qui font que la délivrance ultrasonique n'est pas strictement identique entre les individus. De plus, bien que le geste ne soit pas complexe, le succès de l'injection rétro-orbitaire des microbulles ne peut être garanti car il est impossible de vérifier si l'aiguille se trouve bien dans le sinus. Malgré tout, la réalisation de séances répétées permettait de relativement homogénéiser les différences de la délivrance des ultrasons au cours des séances.

En ce qui concernait les données obtenues par imagerie TEP, aucune variation significative n'a pu être observée entre les différentes semaines d'ultrasons, néanmoins une augmentation significative de la neuro-inflammation entre la semaine 0 et la semaine 6 a pu être mise en évidence chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Ceci suggérerait que, dans l'éventualité d'une application thérapeutique ultérieure, la réalisation précoce et anticipée de sessions d'ultrasons transcrâniens (avant l'apparition des signes de la maladie d'Alzheimer), doit être davantage répétée sur la durée pour que des effets plus nets sur les phénomènes inflammatoires puissent être obtenus.

L'âge des souris ayant subi les sessions d'imageries TEP était peut-être trop précoce (9-10 mois d'âge) par rapport aux différences intersexuelles sur l'affection amyloïde. L'évolution plus lente des lésions amyloïdes chez les femelles pourrait peut-être être à l'origine d'un décalage des phénomènes inflammatoires. Une non-homogénéité plus importante que prévue des groupes de souris utilisés, ainsi qu'un nombre trop faible d'animaux, pourrait expliquer le défaut de significativité de nos résultats obtenus en imagerie TEP.

Une hypothèse à explorer sur ces résultats obtenus en TEP est que les traitements ultrasons transcrâniens n'augmentent pas suffisamment le nombre de cellules microgliales activées (et donc le signal TSPO) pour que cela puisse être perçu en imagerie TEP, mais induisent plutôt un phénotype microglial particulier augmentant les capacités de phagocytose des cellules microgliales et expliquant la clairance amyloïde induite par ultrasons démontrée et publiée par Leinenga et Götz (Leinenga et Götz, 2015 ; Edison *et al.*, 2018). L'utilisation de radioligands spécifiques des type M1 (pro-inflammatoire) et type M2 (anti-inflammatoire) pourrait être intéressante, mais cette dichotomie fait encore débat dans le milieu de la recherche (Janssen *et al.*, 2018).

De plus, la littérature montre également que malgré une fixation forte d'un radiotracteur de l'amyloïde ($[^{11}\text{C}]\text{-PIB}$) chez les souris transgéniques *APP*, le signal TSPO visible en TEP est toujours beaucoup plus discret que chez les souris transgéniques tau (Mori *et al.*, 2012).

Pour l'imagerie TEP de TSPO chez la souris, bien que la fixation du radiotracteur soit influencée par la perfusion tissulaire, il n'existe actuellement pas de meilleure méthode de quantification que celle utilisée dans notre étude. La précision de la quantification pourrait être améliorée par la prise en compte de l'effet du volume partiel, que nous n'avons pas réalisée.

La mise au point du protocole de western blot pour la quantification de la charge amyloïde cérébrale pourra peut-être nous apporter davantage de réponses, avec surtout, la réalisation des marquages immunohistochimiques de la TSPO, des cellules microgliales, des astrocytes et des plaques amyloïdes, qui sont imminents.

Ces travaux qui vont être poursuivis pour la réalisation d'une thèse de sciences sur une période de trois ans essayeront de répondre aux questions inhérentes à notre principale hypothèse de travail selon laquelle les ultrasons induiraient une neuro-inflammation bénéfique et déclencheraient une clairance amyloïde, à savoir :

- Est-ce que ces premiers résultats obtenus sont bien reproductibles et peut-on confirmer que les ultrasons sont bien à l'origine d'une neuro-inflammation détectable par imagerie TEP de la protéine TSPO ?
- Quelles sont les cellules gliales impliquées, à quel moment et sur quelle période ? Nous espérons pouvoir y répondre par la réalisation de nouvelles études longitudinales *in vivo* combinées à la réalisation, à différents temps clés du protocole de traitement par ultrasons, d'études *ex vivo* comme l'autoradiographie, l'immunohistochimie, et la PCR *in situ* (*Polymerase Chain Reaction*). Ces études pourront apporter des réponses chronologiques sur les différents acteurs gliaux impliqués dans cette neuro-inflammation induite par les ultrasons.
- Est-ce que la neuro-inflammation qui est induite par les ultrasons est bien à l'origine d'une diminution de la charge amyloïde ? Nous essayerons d'y répondre par la quantification du peptide A β et de ses oligomères par la réalisation de western blot ;
- Enfin, est-ce que cette neuro-inflammation et cette clairance amyloïde sont associées à l'amélioration des troubles cognitifs caractérisant la maladie d'Alzheimer ? Nous essayerons également d'y répondre par la réalisation de tests comportementaux chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer. Il pourrait également être intéressant de mettre au point de nouveaux tests comportementaux et de déterminer quels sont les tests les plus discriminants pour notre

étude. Les tests d'évitement passif et actif et les tests de conditionnement à la peur sont des exemples de tests comportementaux qu'il serait intéressant d'étudier sur le modèle souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}*.

Nous étudierons ces différentes questions sur une fenêtre de temps plus large. En effet, nous espérons pouvoir mener ces études longitudinales sur plusieurs mois afin de déceler les effets à plus long terme des ultrasons. Nous étayerons également ces résultats par l'utilisation d'un autre modèle rongeur de la maladie d'Alzheimer : le rat *TgF344*, qui est également comme la souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}*, double transgénique pour les gènes *APP* et *PSI*, mais qui présente contrairement au modèle souris, une affection tau associée aux lésions amyloïdes, et est ainsi plus représentatif de la maladie d'Alzheimer (Cohen *et al.*, 2013).

Une autre étape et une perspective intéressante seraient bien sûr d'associer la perméabilisation de la BHE à la délivrance de molécules thérapeutiques afin de potentialiser l'effet thérapeutique des ultrasons.

CONCLUSION

La maladie d'Alzheimer est une maladie incurable dont la prévalence augmente avec les années. Elle est un véritable enjeu de santé publique et l'ensemble de la recherche scientifique concentre maintenant ses efforts sur l'implication neuro-inflammatoire dans la physiopathologie de la maladie. Les nombreux progrès de la science dans l'élaboration de modèles animaux pertinents et de techniques d'imagerie non invasives ont permis d'explorer le décours de la maladie par la réalisation d'études longitudinales *in vivo* sur l'animal modèle.

Cette thèse s'est proposée d'étudier l'hypothèse de l'induction d'une neuro-inflammation bénéfique déclenchée par la perméabilisation de la BHE par la délivrance d'ultrasons transcrâniens, chez la souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}* modèle de la maladie d'Alzheimer.

Les études comportementales ont pu révéler des tendances à l'amélioration des performances cognitives testées chez les souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}* traitées par ultrasons, confortant les résultats qui avaient pu être obtenus dans la littérature.

Pour la première fois, l'imagerie TEP de la TSPO a été utilisée chez ces modèles de la maladie d'Alzheimer traités par ultrasons. Cette étude longitudinale a concentré des technologies variées : les ultrasons, l'imagerie TEP, les techniques de biologie moléculaire comme le western blot et l'immunohistochimie. La quantification du radioligand de la TSPO a permis de révéler une augmentation de la neuro-inflammation après traitement par ultrasons chez les souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}* comparativement aux souris *APP_{swe}/PSI_{dE9}* non traitées par ultrasons et aux souris WT.

La poursuite de cette étude par la réalisation de la quantification de la charge amyloïde ainsi que par la réalisation d'immunohistochimie permettra peut-être d'apporter davantage de réponses sur le rôle des ultrasons sur la clairance amyloïde ainsi que sur le type de cellules gliales activé par les ultrasons.

Le rôle thérapeutique des ultrasons sur la clairance amyloïde et sur les performances cognitives des rongeurs qui a été démontré dans la littérature constitue un véritable espoir pour la quête d'un traitement de la maladie d'Alzheimer. Il est nécessaire d'en explorer les mécanismes, et le lien étroit entre la BHE et les phénomènes neuro-inflammatoires fait qu'il est intéressant de continuer les recherches sous l'angle neuro-inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

- AISEN P.S. (2009) Alzheimer's disease therapeutic research: the path forward. *Alzheimers Res Ther* 1(1), 2
- ALEKSIS R., OLESKOVS F., JAUDZEMS K., PAHNKE J., BIVERSTÅL H. (2017) Structural studies of amyloid- β peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie* 140, 176-192
- ALEXANDRU A., JAGLA W., GRAUBNER S., *et al.* (2011) Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A Is Induced by Pyroglutamate-A Formation. *Journal of Neuroscience* 31(36), 12790-12801
- ALPÉROVITCH A., AMOUYEL P., DARTIGUES J.-F., *et al.* (2002) Les études épidémiologiques sur le vieillissement en France : de l'étude Paquid à l'étude des Trois Cités. *Comptes Rendus Biologies* 325(6), 665-672
- Alzheimer's Disease (s. d.) . [<http://souforum.com/2016/11/23/4-alzheimers-disease/>]
- APPswe/PSEN1dE9 | ALZFORUM (s. d.). [<https://www.alzforum.org/research-models/appswepsen1de9-0>] (consulté le 05/09/2018).
- BACSKAI B.J., FROSCHE M.P., FREEMAN S.H., *et al.* (2007) Molecular Imaging With Pittsburgh Compound B Confirmed at Autopsy: A Case Report. *Archives of Neurology* 64(3), 431
- BALDUCCI C., FORLONI G. (2018) Novel targets in Alzheimer's disease: A special focus on microglia. *Pharmacol. Res.* 130, 402-413
- BECHMANN I. (2005) Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med.* 7(3), 217-228
- BERR C., AKBARALY T.N., NOURASHEMI F., ANDRIEU S. (2007) Épidémiologie des démences. *La Presse Médicale* 36(10), 1431-1441
- BILLINGHAM R.E., BOSWELL T. (1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 141(904), 392-406
- BIRKS J.S. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *In Cochrane Database of Systematic Reviews.* Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd
- BRENNER M. (2014) Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci. Lett.* 565, 7-13
- BURGUILLOS M.A., DEIERBORG T., KAVANAGH E., *et al.* (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472(7343), 319-324
- CAGNIN A., BROOKS D.J., KENNEDY A.M., *et al.* (2001) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *The Lancet* 358(9280), 461-467
- CAPPA S.F. (2018) The Quest for an Alzheimer Therapy. *Front Neurol* 9, 108
- CARRANO A., HOOZEMANS J.J.M., VAN DER VIES S.M., *et al.* (2012) Neuroinflammation and

Blood-Brain Barrier Changes in Capillary Amyloid Angiopathy. *Neurodegenerative Diseases* 10(1-4), 329-331

CHAKRABARTY P., TIANBAI L., HERRING A., *et al.* (2012) Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol Neurodegener* 7, 36

CHANEY A., BAUER M., BOCHICCHIO D., *et al.* (2018) Longitudinal investigation of neuroinflammation and metabolite profiles in the APP^{swe} ×PS1 Δ e9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 144(3), 318-335

CIRRITO J.R. (2005) P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation* 115(11), 3285-3290

COHEN R.M., REZAI-ZADEH K., WEITZ T.M., *et al.* (2013) A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A β , and Frank Neuronal Loss. *Journal of Neuroscience* 33(15), 6245-6256

COLE S.L., VASSAR R. (2007) The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2, 22

COLEMAN R.E. (2005) Positron Emission Tomography Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clinics of North America* 15(4), 837-846

CORONEL R., BERNABEU-ZORNOZA A., PALMER C., *et al.* (2018) Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*

CRAWSHAW A.A., ROBERTSON N.P. (2017) The role of TSPO PET in assessing neuroinflammation. *J. Neurol.* 264(8), 1825-1827

CUMMINGS B.J., HEAD E., RUEHL W., MILGRAM N.W., COTMAN C.W. (1996) The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiology of Aging* 17(2), 259-268

DAMONT A., ROEDA D., DOLLÉ F. (2013) The potential of carbon-11 and fluorine-18 chemistry: illustration through the development of positron emission tomography radioligands targeting the translocator protein 18 kDa: Carbon-11/fluorine-18 chemistry devoted to the preparation of TSPO 18 kDa PET-radioligands. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 56(3-4), 96-104

DANEMAN R., PRAT A. (2015) The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1), a020412

DARTIGUES J.-F., HELMER C., LETENNEUR L., *et al.* (2012) Paquid 2012: illustration and overview. *Gériatrie et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillessement* n°3, 325–331

DEANE R., WU Z., SAGARE A., *et al.* (2004) LRP/Amyloid β -Peptide Interaction Mediates Differential Brain Efflux of A β Isoforms. *Neuron* 43(3), 333-344

DENAYER T., STÖHR T., ROY M.V. (2014) Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* 2(1), 5

DEWITT D.A., PERRY G., COHEN M., DOLLER C., SILVER J. (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 149(2), 329-340

- DUBOIS B. (2009) Actualités de la maladie d'Alzheimer. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 67(2), 116-126
- EDISON P., DONAT C.K., SASTRE M. (2018) In vivo Imaging of Glial Activation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology* 9
- EHEHALT R., KELLER P., HAASS C., THIELE C., SIMONS K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* 160(1), 113-123
- ERICKSON M.A., BANKS W.A. (2013) Blood–Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33(10), 1500-1513
- FARKAS E., LUITEN P.G.. (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 64(6), 575-611
- FRANCIS P.T., PALMER A.M., SNAPE M., WILCOCK G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66(2), 137-147
- GAITERI C., MOSTAFAVI S., HONEY C.J., DE JAGER P.L., BENNETT D.A. (2016) Genetic variants in Alzheimer disease — molecular and brain network approaches. *Nature Reviews Neurology* 12(7), 413-427
- GARCIA-ALLOZA M., ROBBINS E.M., ZHANG-NUNES S.X., *et al.* (2006) Characterization of amyloid deposition in the APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24(3), 516-524
- GHOSH S., WU M.D., SHAFTEL S.S., *et al.* (2013) Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J. Neurosci.* 33(11), 5053-5064
- GOEDERT M., SPILLANTINI M.G., POTIER M.C., ULRICH J., CROWTHER R.A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8(2), 393-399
- GÖTZ J., BODEA L.-G., GOEDERT M. (2018) Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*
- GOURAS G.K., ALMEIDA C.G., TAKAHASHI R.H. (2005) Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 26(9), 1235-1244
- GRAEBER M.B., LI W., RODRIGUEZ M.L. (2011) Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett.* 585(23), 3798-3805
- HAMELIN L., LAGARDE J., DOROTHÉE G., *et al.* (2016) Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain* 139(Pt 4), 1252-1264
- HELMER C., PÉRÈS K., LETENNEUR L., *et al.* (2006) Dementia in Subjects Aged 75 Years or Over within the PAQUID Cohort: Prevalence and Burden by Severity. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 22(1), 87-94
- HENEKA M.T., CARSON M.J., EL KHOURY J., *et al.* (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's

disease. *Lancet Neurol* 14(4), 388-405

HEURLING K., LEUZY A., JONASSON M., *et al.* (2017) Quantitative positron emission tomography in brain research. *Brain Research* 1670, 220-234

HONIG L.S., MAYEUX R. (2001) Natural history of Alzheimer's disease. *Aging (Milano)* 13(3), 171-182

HOOIJMANS C.R., VAN DER ZEE C.E.E.M., DEDEREN P.J., *et al.* (2009) DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiology of Disease* 33(3), 482-498

HOPPERTON K.E., MOHAMMAD D., TRÉPANIER M.O., GIULIANO V., BAZINET R.P. (2018) Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol. Psychiatry* 23(2), 177-198

ILIFF J.J., WANG M., LIAO Y., *et al.* (2012) A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid. *Science Translational Medicine* 4(147), 147ra111-147ra111

IQBAL K., ZAIDI T., BANCHER C., GRUNDKE-IQBAL I. (1994) Alzheimer paired helical filaments. Restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Lett.* 349(1), 104-108

IQBAL K., LIU F., GONG C.-X. (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nature Reviews Neurology* 12(1), 15-27

ITTNER L.M., KE Y.D., DELERUE F., *et al.* (2010) Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142(3), 387-397

ITTNER A., CHUA S.W., BERTZ J., *et al.* (2016) Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- β toxicity in Alzheimer's mice. *Science* 354(6314), 904-908

JAMES M.L., FULTON R.R., VERCOULLIE J., *et al.* (2008) DPA-714, a New Translocator Protein-Specific Ligand: Synthesis, Radiofluorination, and Pharmacologic Characterization. *Journal of Nuclear Medicine* 49(5), 814-822

JANKOWSKY J.L., FADALE D.J., ANDERSON J., *et al.* (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum. Mol. Genet.* 13(2), 159-170

JANSSEN B., VUGTS D., WINDHORST A., MACH R. (2018) PET Imaging of Microglial Activation—Beyond Targeting TSPO. *Molecules* 23(3), 607

KOVACS Z.I., KIM S., JIKARIA N., *et al.* (2017) Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(1), E75-E84

KUMAR A., TSAO J.W. (2018) Alzheimer Disease. *In StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing

KUMMER M.P., HERMES M., DELEKARTE A., *et al.* (2011) Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron* 71(5), 833-844

LAAKSO M.P., SOININEN H., PARTANEN K., *et al.* (1998) MRI of the hippocampus in Alzheimer's disease: sensitivity, specificity, and analysis of the incorrectly classified subjects.

Neurobiol. Aging 19(1), 23-31

LANOISELÉE H.-M., NICOLAS G., WALLON D., *et al.* (2017) APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLOS Medicine* 14(3), e1002270

LASAGNA-REEVES C.A., CASTILLO-CARRANZA D.L., SENGUPTA U., *et al.* (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular Neurodegeneration* 6(1), 39

LEINENGA G., GÖTZ J. (2015) Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Transl Med* 7(278), 278ra33

LETENNEUR L., DEQUAE L., JACQMIN H., *et al.* (1993) [Prevalence of dementia in Gironde (France)]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 41(2), 139-145

LI X., KUMAR Y., ZEMPEL H., *et al.* (2011) Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration: Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons. *The EMBO Journal* 30(23), 4825-4837

LI C., GÖTZ J. (2017) Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *The EMBO Journal* 36(21), 3120-3138

LIDDELOW S.A., GUTTENPLAN K.A., CLARKE L.E., *et al.* (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541(7638), 481-487

L'imagerie de la maladie d'Alzheimer en pratique clinique - Journées Francophones de Radiologie, Paris, 23 Octobre. (2010)

LOERA-VALENCIA R., PIRAS A., ISMAIL M.A.M., *et al.* (2018) Targeting Alzheimer's Disease with Gene and Cell Therapies. *Journal of Internal Medicine*

LOUVEAU A., HARRIS T.H., KIPNIS J. (2015) Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology* 36(10), 569-577

LUDEWIG S., KORTE M. (2017) Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9

LUE L.F., RYDEL R., BRIGHAM E.F., *et al.* (2001) Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia* 35(1), 72-79

MAGNIN R., RABUSSEAU F., SALABARTAN F., *et al.* (2015) Magnetic resonance-guided motorized transcranial ultrasound system for blood-brain barrier permeabilization along arbitrary trajectories in rodents. *J Ther Ultrasound* 3, 22

Maladie d'Alzheimer et maladie apparentées : diagnostic et prise en charge. Décembre. (2011) . Haute Autorité de Santé (HAS)

MANDELKOW E., VON BERGEN M., BIERNAT J., MANDELKOW E.-M. (2007) Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease. *Brain Pathology* 17(1), 83-90

MARCHITELLI R., AIELLO M., CACHIA A., *et al.* (2018) Simultaneous resting-state FDG-PET/fMRI in Alzheimer Disease: Relationship between glucose metabolism and intrinsic activity.

NeuroImage 176, 246-258

MARIN M.A., ZIBURKUS J., JANKOWSKY J., RASBAND M.N. (2016) Amyloid- β plaques disrupt axon initial segments. *Experimental Neurology* 281, 93-98

MARTY B., LARRAT B., VAN LANDEGHEM M., *et al.* (2012) Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(10), 1948-1958

MASTERS C.L., BATEMAN R., BLENNOW K., *et al.* (2015) Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers* , 15056

MATARIN M., SALIH D.A., YASVOINA M., *et al.* (2015) A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology. *Cell Reports* 10(4), 633-644

MAYEUX R., STERN Y. (2012) Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(8), a006239-a006239

MCGOWAN E., PICKFORD F., KIM J., *et al.* (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47(2), 191-199

MERLINI M., MEYER E.P., ULMANN-SCHULER A., NITSCH R.M. (2011) Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta Neuropathologica* 122(3), 293-311

MILLER D.B., O'CALLAGHAN J.P. (2017) New horizons for focused ultrasound (FUS) – therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *Metabolism* 69, S3-S7

MINTUN M.A., LAROSSA G.N., SHELINE Y.I., *et al.* (2006) [11C]PIB in a nondemented population: Potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 67(3), 446-452

MORI T., MAEDA J., SHIMADA H., *et al.* (2012) Molecular imaging of dementia: Molecular imaging for dementia. *Psychogeriatrics* 12(2), 106-114

MORSCH R., SIMON W., COLEMAN P.D. (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58(2), 188-197

MOSCONI L. (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease: FDG-PET studies in MCI and AD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 32(4), 486-510

MOSCONI L., PUPI A., DE LEON M.J. (2008) Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147(1), 180-195

MÜLLER U.C., DELLER T. (2017) Editorial: The Physiological Functions of the APP Gene Family. *Front Mol Neurosci* 10, 334

NALIVAEVA N.N., BELYAEV N.D., KERRIDGE C., TURNER A.J. (2014) Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6

NATHAN C., CALINGASAN N., NEZEZON J., *et al.* (2005) Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 202(9),

1163-1169

OBERMEIER B., DANEMAN R., RANSOHOFF R.M. (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine* 19(12), 1584-1596

ORDOÑEZ-GUTIERREZ L., FERNANDEZ-PEREZ I., HERRERA J.L., *et al.* (2016) A β PP/PS1 Transgenic Mice Show Sex Differences in the Cerebellum Associated with Aging. *J. Alzheimers Dis.* 54(2), 645-656

OZCELIK S., SPRENGER F., SKACHOKOVA Z., *et al.* (2016) Co-expression of truncated and full-length tau induces severe neurotoxicity. *Molecular Psychiatry* 21(12), 1790-1798

PALOP J.J., CHIN J., MUCKE L. (2006) A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113), 768-773

PAPADOPOULOS V., BARALDI M., GUILARTE T.R., *et al.* (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences* 27(8), 402-409

PARK R., KOOK S.-Y., PARK J.-C., MOOK-JUNG I. (2014) A β 1–42 reduces P-glycoprotein in the blood–brain barrier through RAGE–NF- κ B signaling. *Cell Death & Disease* 5(6), e1299-e1299

PEKKNY M., WILHELMSSON U., PEKNA M. (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters* 565, 30-38

POLANCO J.C., LI C., BODEA L.-G., *et al.* (2017) Amyloid- β and tau complexity — towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nature Reviews Neurology* 14(1), 22-39

QUERFURTH H.W., LAFERLA F.M. (2010) Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362(4), 329-344

RITCHIE K., CARRIERE I., RITCHIE C.W., *et al.* (2010) Designing prevention programmes to reduce incidence of dementia: prospective cohort study of modifiable risk factors. *BMJ* 341(aug05 2), c3885-c3885

RUPPRECHT R., PAPADOPOULOS V., RAMMES G., *et al.* (2010) Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 9(12), 971-988

SAGARE A.P., BELL R.D., ZHAO Z., *et al.* (2013) Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nature Communications* 4(1)

SAIJO K., GLASS C.K. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11(11), 775-787

SALTER M.W., STEVENS B. (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* 23(9), 1018-1027

SCARCELLI T., JORDÃO J.F., O'REILLY M.A., *et al.* (2014) Stimulation of hippocampal neurogenesis by transcranial focused ultrasound and microbubbles in adult mice. *Brain Stimul* 7(2), 304-307

SCHELTENS P., LEYS D., BARKHOF F., *et al.* (1992) Atrophy of medial temporal lobes on MRI in « probable » Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55(10), 967-972

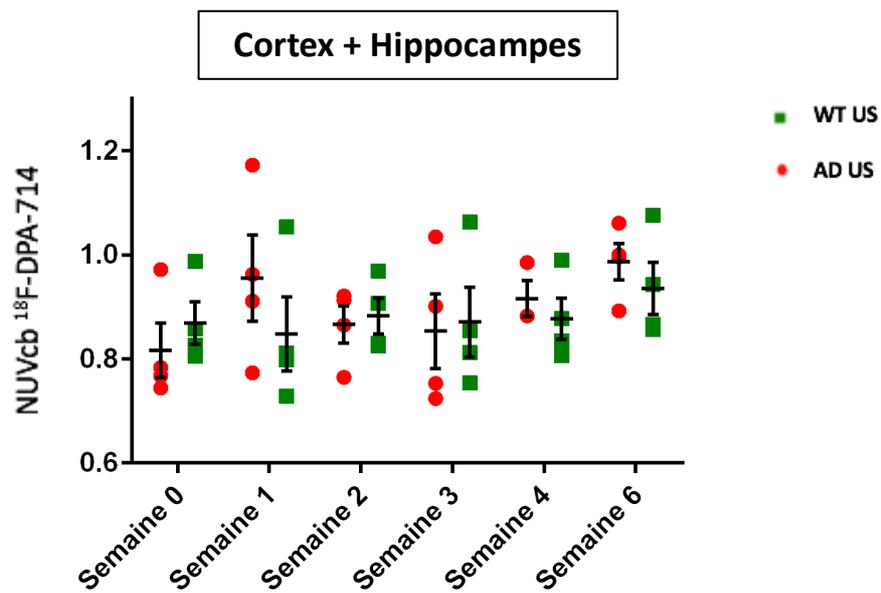
- SCHELTENS P., LEYS D., BARKHOF F., *et al.* (1994) Contribution de l'imagerie morphologique au diagnostic des démences. I — Maladie d'Alzheimer. *La Revue de Médecine Interne* 15(6), 415-422
- SCHÜTT T., HELBOE L., PEDERSEN L.Ø., *et al.* (2016) Dogs with Cognitive Dysfunction as a Spontaneous Model for Early Alzheimer's Disease: A Translational Study of Neuropathological and Inflammatory Markers. *Journal of Alzheimer's Disease* 52(2), 433-449
- SELKOE D.J., HARDY J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8(6), 595-608
- SENGILLO J.D., WINKLER E.A., WALKER C.T., *et al.* (2013) Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood-Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease: Pericytes in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology* 23(3), 303-310
- SHEEHAN B. (2012) Assessment scales in dementia. *Ther Adv Neurol Disord* 5(6), 349-358
- STREIT W.J., WALTER S.A., PENNELL N.A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57(6), 563-581
- STROHMEYER R., RAMIREZ M., COLE G.J., MUELLER K., ROGERS J. (2002) Association of factor H of the alternative pathway of complement with agrin and complement receptor 3 in the Alzheimer's disease brain. *J. Neuroimmunol.* 131(1-2), 135-146
- Synthèse d'avis de la Commission de la transparence, Haute Autorité de Santé, 19 octobre 2016. (2016)
- TAKAHASHI R.H., NAGAO T., GOURAS G.K. (2017) Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease: Intraneuronal accumulation of β -amyloid. *Pathology International* 67(4), 185-193
- TARKOWSKI E., ANDREASEN N., TARKOWSKI A., BLENNOW K. (2003) Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74(9), 1200-1205
- TOHIDPOUR A., MORGUN A.V., BOITSOVA E.B., *et al.* (2017) Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7
- TRACY T.E., SOHN P.D., MINAMI S.S., *et al.* (2016) Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron* 90(2), 245-260
- TRITSCH D., CHESNOY-MARCHAIS D., FELTZ A. (1999) *Physiologie du neurone*, Doin. ed
- TROMBELLA S., ASSAL F., ZEKRY D., *et al.* (2016) [Brain imaging of Alzheimer' disease: state of the art and perspectives for clinicians]. *Rev Med Suisse* 12(515), 795-798
- VODOVOTZ Y., LUCIA M.S., FLANDERS K.C., *et al.* (1996) Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 184(4), 1425-1433
- WANG Z.-X., TAN L., LIU J., YU J.-T. (2016) The Essential Role of Soluble A β Oligomers in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 53(3), 1905-1924
- WEINER M.W., VEITCH D.P., AISEN P.S., *et al.* (2013) The Alzheimer's Disease Neuroimaging

- Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimer's & Dementia* 9(5), e111-e194
- WEINER H.L., FRENKEL D. (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6(5), 404-416
- WELLER J., BUDSON A. (2018) Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* 7, 1161
- YANG J., LUNDE L.K., NUNTAGIJ P., *et al.* (2011) Loss of Astrocyte Polarization in the Tg-ArcSwe Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 27(4), 711-722
- YOO S.-S., BYSTRITSKY A., LEE J.-H., *et al.* (2011) Focused ultrasound modulates region-specific brain activity. *Neuroimage* 56(3), 1267-1275
- Yu Yamazaki, Takahisa Kanekiyo (2017) Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 18(9), 1965

ANNEXES

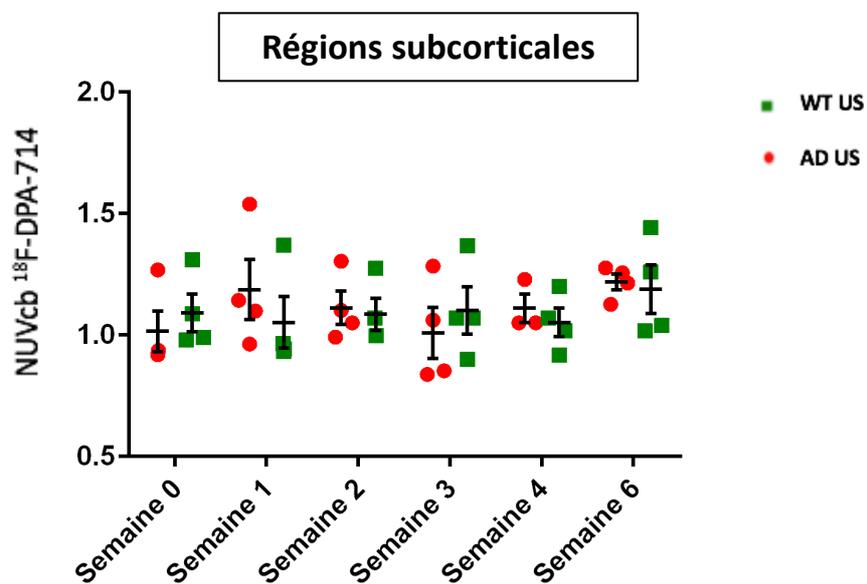
Annexe 1 : Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 dans le cortex et l'hippocampe exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).

AD US : souris APP/PS1 traitées par ultrasons, $n=4$. **WT US** : souris WT traitées par ultrasons, $n=4$.



Annexe 2 : Quantification de la fixation du ^{18}F -DPA-714 dans les régions subcorticales exprimée en NUV_{cb} (« Normalized to cerebellum uptake values »).

AD US : souris APP/PS1 traitées par ultrasons, $n=4$. **WT US** : souris WT traitées par ultrasons, $n=4$.



ÉTUDE DES MÉCANISMES NEURO-INFLAMMATOIRES IMPLIQUÉS DANS LA CLAIRANCE AMYLOÏDE INDUITE PAR DES PERMÉABILISATIONS PHYSIQUES RÉPÉTÉES DE LA BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE CHEZ LES RONGEURS MODÈLES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

CARDONA Venetia

Résumé

L'agrégation de protéines anormales au sein du parenchyme cérébral est à l'origine d'une mort progressive des neurones qui est impliquée dans un grand nombre de maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable se caractérisant par des dépôts amyloïdes provoquant progressivement et irrémédiablement la dégénérescence du cerveau et une perte de mémoire. Récemment, deux équipes de recherche ont montré que l'ouverture répétée de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par ultrasons était à l'origine d'une baisse significative de la charge en plaques amyloïdes chez des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer, et ceci sans aucune intervention pharmacologique. Cette clairance était de plus accompagnée d'une normalisation de certaines performances cognitives comme la mémoire spatiale de travail.

Cependant, le mécanisme d'ouverture de la BHE par ultrasons ainsi que l'effet thérapeutique sur la charge amyloïde restent encore mal connus. L'hypothèse principale pour expliquer ce phénomène serait l'induction d'une réponse immunitaire favorable. Alors que de nombreuses molécules se révèlent être des échecs thérapeutiques dans le traitement des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la compréhension de ces mécanismes neuro-inflammatoires induits par ultrasons constitue un véritable espoir pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques non invasives.

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser les fonctions mnésiques des souris *APP_{swe}/PSI_{DE9}*, modèles de la maladie d'Alzheimer, ainsi que la réponse neuro-inflammatoire induite par ultrasons. La neuro-inflammation a pu être étudiée par le suivi d'un radioligand spécifique de la protéine translocatrice 18 kDa (TSPO), lors d'imagerie par tomographie par émission de positons après chaque session d'ultrasons transcrâniens.

Cette étude a permis de révéler pour la première fois une augmentation de la neuro-inflammation après traitement par ultrasons chez les souris *APP_{swe}/PSI_{DE9}* comparativement aux souris contrôles, ainsi que des tendances à l'amélioration des performances cognitives testées chez les souris *APP_{swe}/PSI_{DE9}* traitées par ultrasons, confortant les résultats qui avaient pu être obtenus dans la littérature.

La réalisation ultérieure de la quantification de la charge amyloïde et la caractérisation du statut neuro-inflammatoire permettront d'aller plus loin dans les conclusions tirées de cette étude.

Mots clés: MALADIE D'ALZHEIMER, SYSTÈME NERVEUX CENTRAL, ASTROCYTE, MICROGLIE, NEURONE, INFLAMMATION, TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS, BARRIÈRE HÉMATO-ENCÉPHALIQUE, MODÈLE ANIMAL, RONGEUR, SOURIS.

Jury :

Président : Pr

Directeur : Pr Fanny Pilot-Storck

Assesseur : Pr Stéphane Blot

STUDY OF NEURO-INFLAMMATORY MECHANISMS INVOLVED IN AMYLOID CLEARANCE INDUCED BY REPEATED PHYSICAL PERMEABILIZATIONS OF THE BLOOD BRAIN BARRIER IN RODENT MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

CARDONA Venetia

Summary

The aggregation of abnormal proteins within the brain parenchyma causes progressive death of neurons and is involved in a large number of neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease is an incurable neurodegenerative disease characterized by amyloid deposits, gradually and irreversibly causing brain degeneration and memory loss.

Recently, it has been shown that the repeated opening of the blood-brain barrier (BBB) by ultrasound induced a significant decrease of the amyloid load in transgenic mice model of AD, without any pharmacological intervention. This clearance was further accompanied by a normalization of cognitive performance.

However, the mechanism of ultrasonic BBB disruption responsible for the therapeutic effect on amyloid load is still poorly understood. The main hypothesis would be the induction of a favorable immune response. While many molecules fail in clinical trials for a treatment of AD patients, the understanding of these ultrasonic-induced therapeutic neuroinflammatory mechanisms is a real hope for the development of new non-invasive ultrasound therapeutic strategies.

In this study, we investigated the memory functions of *APP_{swe}/PSI_{De9}* mice, models of Alzheimer's disease, as well as their ultrasound-induced neuroinflammatory state. Neuroinflammation could be studied by monitoring a specific radioligand of the translocator protein 18kDa (TSPO), by positron emission tomography imaging after each transcranial ultrasound session.

This study revealed for the first time an increase of neuroinflammation after ultrasound treatment in *APP_{swe}/PSI_{de9}* mice compared to control mice, as well as trends of improvements in the cognitive performances tested in *APP_{swe}/PSI_{de9}* mice treated with ultrasound, as it has been demonstrated in the literature.

Subsequent quantification of the amyloid charge and the characterization of neuroinflammatory status will go further in the conclusions drawn from this study.

Keywords: ALZHEIMER'S DISEASE, CENTRAL NERVOUS SYSTEM, ASTROCYTE, MICROGLIA, NEURON, INFLAMMATION, POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY, BLOOD BRAIN BARRIER, ANIMAL MODEL, RODENT, MOUSE.

Jury :

President : Pr

Director : Pr Fanny Pilot-Strock

Assessor : Pr Stéphane Blot