



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 5098

To cite this version :

Burlot, Marie-Anne. *Évaluation de la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46A1) comme cible thérapeutique dans le modèle de souris THY-Tau22 : modulation du métabolisme du cholestérol et maladie d'Alzheimer*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 112 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

EVALUATION DE LA CHOLESTEROL-24-HYDROXYLASE (CYP46A1) COMME CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE MODELE DE SOURIS THY-TAU22

Modulation du Métabolisme du Cholestérol
et
Maladie d'Alzheimer

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marie-Anne BURLOT
Née le 5 mai 1986, à Colombes (92)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Christelle CAMUS

JURY

PRESIDENT :

Mme Bettina COUDERC

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Christelle CAMUS

M. Giovanni MOGICATO

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Mme Nathalie CARTIER

Professeur à l'Université Paris Descartes de PARIS

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*

- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
- Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A la présidente de thèse,

Madame le Professeur Bettina COUDERC

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Médecin biologiste

Qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.
Hommages respectueux.

Au jury de thèse,

Madame le Docteur Christelle CAMUS

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie cellulaire et moléculaire

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse.
Merci de m'avoir fait découvrir la thérapie génique.
Merci pour votre grande disponibilité et vos conseils.
En témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Giovanni MOGICATO

Maître de Conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anatomie

Qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

Madame le Professeur Nathalie CARTIER

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Génétique et biothérapies

Grâce à qui ce travail a pu être réalisé et qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.
Sincères remerciements.

Aux laboratoires INSERM UMR_745 (Paris) et UMR_837 (Lille),

Je tiens à remercier le Pr. Aubourg, directeur de l'unité INSERM 745, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour cette étude.

Je tiens également à remercier le Dr. Cartier d'avoir accepté d'être mon maître de stage pour la seconde fois. Vous m'avez fait confiance et donné notamment l'opportunité de présenter mon travail devant le congrès annuel de la société francophone de thérapies cellulaire et génique et lors de l'Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease, merci.

J'aimerais remercier le Dr. Buée de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche sur Lille, me permettant ainsi de me former à la biochimie de la protéine Tau. Au sein de votre équipe dynamique et chaleureuse, j'ai pu apprécier être au contact de spécialistes des tauopathies.

Je souhaite remercier tout particulièrement Benoit Gautier pour m'avoir encadrée. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, merci de t'être rendu aussi disponible et d'avoir supporté mon caractère stressé et râleur !

Merci à Jennifer Varin, Ingrid Laurendeau et Ivan Bieche de m'avoir inculqué les subtilités de la biologie moléculaire.

Merci à David Blum d'avoir toujours été très disponible pour toutes les questions que j'ai pu avoir sur le modèle et sur la pathologie Tau plus généralement. Merci à Raphaëlle Caillierez et Nadège Zommer pour ce qu'elles m'ont enseigné en immunohistochimie et l'aide qu'elles m'ont apportée. Merci à Laetitia Troquier et Dominique Demeyer pour les connaissances qu'elles m'ont enseignées et leur aide en biochimie. Plus généralement, merci à tous les membres de l'équipe 1 de l'UMR_837 pour tous les petits conseils qu'ils ont pu me donner avec bonne humeur.

Merci à Fathia Djelti pour ce qu'elle m'a appris en neurosciences. Merci pour le travail que tu réalises sur les sh, il permettra une compréhension mécanistique des plus utiles. Merci à Françoise Piguet, qui est partie sous le soleil milanais, de m'avoir révélé les petits secrets des injections stéréotaxiques. Merci à Jérôme Braudeau d'avoir été le M. Morris de l'équipe ! Merci également de m'avoir enseigné les statistiques d'une façon plus poussée qu'en Ecole vétérinaire, même si certaines notions restent encore un peu obscures... Merci à Virginie Bellassen d'avoir corrigé mes interventions en anglais. Merci également à Léa, notre formidable secrétaire.

Merci enfin à tous les membres de l'équipe UMR_745 pour leur accueil : Gaëlle, Mathieu, Céline, Virginie, Karelia, Caroline, Françoise F. Et surtout un grand merci à Michel et Dominique Vidaud qui ont pris le temps d'écouter et de corriger mes différentes présentations orales.

A ma famille,

Merci Maman d'avoir toujours été là pour moi. Merci de m'avoir transmis ton amour des bêtes et de la nature, ainsi que ton intérêt pour les sciences médicales. Merci de m'avoir inculqué de grandes notions telles que le respect d'autrui, la tolérance, la sincérité, l'amitié et l'amour. Merci de m'avoir permis de devenir ce que je suis maintenant. Je t'aime.

Merci Christian pour ta disponibilité et la grande écoute dont tu as toujours su faire preuve. Merci pour ton soutien durant ces longues années d'études. Merci pour toutes ces longues discussions sur la psychologie humaine, ce n'est peut-être pas pour rien que je me plais en neuro maintenant ! Merci à la famille Fouchard.

Merci Papa, Laure, Alice, Quentin et Adrien.

Merci Mamm (et non mémé coz !) et Taco pour votre amour et votre générosité. Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci d'avoir fait de moi une moitié de bretonne, je suis fière de mes origines ! Merci pour tous les dessins et peintures que vous m'avez faits, j'y suis toujours très sensible.

Merci Mamie pour ton amour. J'espère que je serai aussi dynamique que toi lorsque j'aurai ton âge !!!

Merci Jean-Claude pour ta générosité.

Merci à mes cousins éloignés : Marion, Mathieu, Thomas et Morgane et les autres que j'ai malheureusement perdus de vue... Marion, j'ai hâte que Bastou et toi soyez en Bretagne, ça sera un encore plus grand plaisir pour moi d'y aller !

Merci à ma belle-famille pour son accueil et sa générosité, belle-maman étant le modèle à suivre dans ce domaine ! Merci à beau-papa de m'avoir permis de rencontrer, de côtoyer et d'apprendre à connaître mon chéri. Nous serions certainement passés l'un à côté de l'autre sans cela. Enfin, merci de me faire découvrir les joies d'avoir une famille nombreuse unie !

Merci à mes deux poilues : Bheda et Grizilh !!! Merci à Luciole, Chipie, Poupik, Voyou, Agathe et Gwiniz, vous me manquez.

« L'homme est le seul animal qui rougisse ; c'est d'ailleurs le seul animal qui ait à rougir de quelque chose. »

George Bernard Shaw

A mes amis,

Merci ma Choukette et ma Mathildou ! Amie depuis plus de 20 ans avec vous, je sais combien j'ai de la chance de vous avoir ! Votre amitié est pour moi un trésor inestimable.

« L'idéal de l'amitié c'est de se sentir un et de rester deux. » Anne-Sophie Swetchine

Merci Deb et Marie pour ces formidables années passées à l'Ecole avec vous, surtout les dernières d'ailleurs ! Nos délires, nos prises de tête, nos sorties, nos discussions de filles resteront à jamais dans ma mémoire. Déjà un an que je suis loin de vous, notre complicité passée me manque. J'espère ne jamais perdre ce lien qui nous unit ! Enfin, un grand merci pour m'avoir permis de faire ma formation à la fac quand on était en rotation aux cliniques.

Merci Nat également. On a appris à se connaître grâce à nos monstres et j'en suis ravie ! Nos promenades communes avec mon panier à crottes et ton sac à gratouille me manquent !

Merci les taties, vous manquez énormément à Bheda !!!

Merci Eléna pour tous ces bons moments que nous avons passés ensemble en Bretagne et pour ceux à venir !

Merci mon petit Chou pour ton amitié ! Ce n'est pas permis à tout le monde de la conserver et j'en suis honorée !! Merci d'être toi, avec ton caractère bien trempé et ton dynamisme hors du commun !!

Merci Laurence pour cette formidable année de seconde. Merci de m'avoir appris la souplesse en amitié, j'en avais besoin ! Je ne souhaite qu'une chose, te voir plus souvent !

Merci Laurianne pour ces années lycée et notre année de sup. Avec nos caractères de cochon et nos tempéraments stressés ça n'a pas toujours été facile entre nous mais notre amitié s'en trouve maintenant renforcée !

Merci Emeline. Et dire que ce sont nos voyages en RER qui nous ont permis de nous retrouver !! Je suis heureuse de te voir de nouveau plus régulièrement. Je vous souhaite tout plein de bonheur à toi et ta petite famille !

Merci aux amis de mon chéri qui sont devenus maintenant les miens.

Merci à mes amis rencontrés au cours de mes années toulousaines : Maia, Enrique, Seb, MP... Les soirées éniaciennes et avec les éniaciens me resteront longtemps en mémoire !

Merci Seb pour toutes les parties de volley du dimanche après-midi ! Maintenant, il faut qu'on se fasse plus de sorties salsa sur Paris.

Merci à Mélanie pour notre inoubliable voyage en Angleterre. Remise à niveau qui était des plus utiles en ce qui me concerne. Ils sont fous ces anglais ! J'aimerais que nous nous voyions plus souvent...

Merci à mes potes copromos véto, à mes docteurs, à mes poulots.

Merci aux potes du Magistère : Marie, Coline, Claire, Chiara, Matteo, Barbara...

Merci aux potes de prépa : Cynthia, Nisrine, Anaïs... Que je ne vois malheureusement plus beaucoup.

A tous les autres,

Merci à François et Patrice de m'avoir embauchée l'année dernière. J'ai ainsi pu faire deux mois de clientèle, ce qui ne m'arrivera sûrement plus à l'avenir. Je suis heureuse d'avoir vécu cette expérience.

Merci à Annick, Monique et Séverine, mes collègues de travail et maintenant amies.

Merci à Hervé Piorowicz de m'avoir prise en stage de si nombreuses fois. Merci à Dalila de m'avoir si bien accueillie.

Merci à Carole et Béa pour leur amitié, c'était un plaisir de travailler avec vous à chaque fois !

Merci au Dr. Crevier-Denoix de m'avoir prise en stage et permis de découvrir le milieu de la recherche en biomécanique équine.

Merci au Dr. Péchayre de m'avoir prise en stage pour une semaine de découverte dans le domaine des courses de galop. Ce fût une très bonne expérience.

Merci enfin à tous ceux avec qui j'ai passé de bons moments et que je n'ai pas cités précédemment.

A Christophe,

Me da gar.

« La distance est à l'amour ce que le vent est au feu, elle attise les grands et éteint les petits. »

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	29
1.1. LA MALADIE D'ALZHEIMER	29
1.1.1. <i>Epidémiologie</i>	29
1.1.2. <i>Clinique</i>	30
1.1.3. <i>Neuropathologie</i>	31
1.1.3.1. Aspect macroscopique.....	31
1.1.3.2. Aspects microscopiques.....	31
1.1.3.2.1. Les dépôts amyloïdes.....	33
1.1.3.2.2. La Dégénérescence NeuroFibrillaire	34
1.1.4. <i>La composante Tau dans la maladie d'Alzheimer</i>	36
1.1.4.1. La protéine Tau	36
1.1.4.2. La pathologie Tau	37
1.1.4.2.1. Mécanisme général.....	37
1.1.4.2.2. Hyperphosphorylation et phosphorylation anormale de Tau	37
1.1.4.2.3. Auto-assemblage de Tau en filaments.....	38
1.1.4.2.4. Les Tauopathies	39
1.2. ANIMAUX MODELES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET DE LA DEMENCE FRONTO- TEMPORALE	40
1.2.1. <i>Gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer chez l'homme</i>	40
1.2.1.1. Formes familiales de la maladie d'Alzheimer	40
1.2.1.2. Formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer	41
1.2.2. <i>Animaux modèles de la maladie d'Alzheimer</i>	42
1.2.2.1. Utilité des animaux modèles	42
1.2.2.2. Modèles non transgéniques	42
1.2.2.3. Modèles transgéniques non mammifères	46
1.2.2.3.1. Etudes chez la drosophile	46
1.2.2.3.2. Etudes chez le nématode	48
1.2.2.3.3. Etudes chez le poisson-zèbre	48
1.2.2.4. Modèles transgéniques mammifères	49
1.2.2.4.1. Etudes chez la souris	49
1.2.2.4.2. Etudes chez le rat	57
1.2.2.5. Critères d'évaluation des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer	58

1.2.2.5.1.	Validité génétique	59
1.2.2.5.2.	Validité moléculaire	59
1.2.2.5.3.	Validité neurochimique	59
1.2.2.5.4.	Validité neurophysiologique	60
1.2.2.5.5.	Validité neuroanatomique	60
1.2.2.5.6.	Validité comportementale	60
1.2.2.5.7.	Apprentissage, mémoire et cognition	61
1.2.2.5.8.	Fiabilité du modèle	62
1.2.2.5.9.	Thérapeutique	62
1.2.3.	Tests comportementaux	63
1.2.3.1.	Evaluation des symptômes cognitifs	63
1.2.3.2.	Evaluation des symptômes non cognitifs	67
1.3.	CHOLESTEROL ET MALADIE D'ALZHEIMER	69
1.3.1.	Le cholestérol dans la maladie d'Alzheimer	69
1.3.1.1.	Aspects épidémiologiques	69
1.3.1.2.	Aspects génétiques	69
1.3.1.3.	Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	70
1.3.1.3.1.	Cholestérol et composante amyloïde	70
1.3.1.3.2.	Cholestérol et composante Tau	70
1.3.2.	Métabolisme intracérébral du cholestérol : CYP46A1 enzyme clé	71
1.4.	MODULATION DE L'EXPRESSION DE CYP46A1 DANS LA SOURIS THY-TAU22 VIA L'UTILISATION D'UN VECTEUR VIRAL ADENO-ASSOCIE CODANT POUR LE TRANSGENE CYP46A1	73
1.4.1.	Choix de l'utilisation d'un vecteur AAV	73
1.4.2.	Le modèle murin THY-Tau22	73
1.4.2.1.	Description du modèle	73
1.4.2.2.	Mutations du transgène humain Tau	76
1.4.2.2.1.	Mutation G272V	76
1.4.2.2.2.	Mutation P301S	77
1.5.	OBJECTIF DE L'ETUDE	77
2.	MATERIELS ET METHODE	77
2.1.	PRODUCTION DU STOCK VIRAL	77

2.2.	MODELES ANIMAUX	78
2.3.	GENOTYPAGE DES SOURIS	78
2.3.1.	<i>Extraction d'ADN</i>	79
2.3.2.	<i>PCR</i>	79
2.4.	INJECTIONS INTRACEREBRALES DE VECTEURS AAV5-CYPWT ET AAV5-CYPMUTE... 80	
2.5.	TEST DE MEMOIRE DE REFERENCE SPATIALE : LA PISCINE DE MORRIS	81
2.5.1.	<i>Descriptif de la piscine de Morris</i>	81
2.5.2.	<i>Protocole expérimental</i>	81
2.5.2.1.	Phase d'habituation	81
2.5.2.2.	Phase d'apprentissage spatial.....	82
2.5.2.3.	Phase de rétention.....	83
2.6.	SACRIFICE DES SOURIS ET PRELEVEMENTS DES TISSUS.....	83
2.7.	ANALYSES IMMUNOHISTOCHIMIQUES.....	84
2.7.1.	<i>Coupe des hémisphères au cryostat</i>	84
2.7.2.	<i>Immunohistochimie par immunoperoxydase</i>	84
2.8.	EXTRACTION D'ARN ET RT-QPCR	85
2.8.1.	<i>Extraction d'ARN</i>	85
2.8.2.	<i>RT-qPCR</i>	85
2.8.2.1.	Transcription inverse	85
2.8.2.2.	PCR quantitative	85
2.8.2.3.	Analyse des résultats	86
2.8.2.4.	Conception des amorces.....	86
2.9.	ANALYSES PROTEIQUES.....	86
2.10.	PRESENTATION DES RESULTATS.....	87
3.	RESULTATS	88
3.1.	GENOTYPE DES SOURIS	88
3.2.	LA SUREXPRESSION DE CYP46A1 NORMALISE LES PERFORMANCES COGNITIVES DES SOURIS THY-TAU22 DANS LE TEST DE LA PISCINE DE MORRIS	88
3.3.	EXPRESSION DES TRANSGENES TAU ET CYP46A1 CHEZ LES SOURIS INJECTEES	90

3.4.	LA SUREXPRESSION DE CYP46A1 DIMINUE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS THY-TAU22	91
3.4.1.	<i>Expression du transgène CYP46A1-HA dans l'ensemble de l'hippocampe</i>	<i>91</i>
3.4.2.	<i>Etude de la phosphorylation de Tau dans l'hippocampe</i>	<i>92</i>
3.5.	ANALYSE BIOCHIMIQUE DE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU DANS L'HIPPOCAMPE DES SOURIS THY-TAU22	93
4.	DISCUSSION	95

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

FIGURE 1 : A : EPIDEMIOLOGIE DE LA MA.....	30
FIGURE 2 : COUPE CORONALE D'UN HEMISPHERE DE CERVEAU HUMAIN SAIN ET DE CERVEAU D'UN PATIENT ATTEINT DE LA MA.	31
FIGURE 3 : COUPE SAGITTALE PRESENTANT L'HIPPOCAMPE EN SITUATION ANATOMIQUE AU SEIN DU LOBE TEMPORAL MEDIAN.	32
FIGURE 4 : COUPES CORONALES D'UN HEMISPHERE CEREBRAL HUMAIN	32
FIGURE 5 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UNE SYNAPSE.....	33
FIGURE 6 : LA γ -SECRETASE FONCTIONNELLE EST EN REALITE UN COMPLEXE FORME DE LA PRESILINE 1, LA NICASTRINE, L'APH-1 ET LA PEN-2 (PSEN2).....	33
FIGURE 7 : LESIONS HISTOLOGIQUES CARACTERISTIQUES DE LA MA	34
FIGURE 8 : CORPS NEUROFIBRILLAIRE (AT8)	35
FIGURE 9 : INTERACTION TAU ET MICROTUBULE.....	36
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE MAPT (TAU) HUMAIN, DE SON ARN MESSAGER ET DE SES SIX ISOFORMES DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.	37
FIGURE 11 : SEQUENCE D'APPARITION DES SITES DE PHOSPHORYLATION DE TAU AU COURS DES STADES D'EVOLUTION CYTOLOGIQUE DE LA DNF).....	38
FIGURE 12 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DE L'AUTO-ASSEMBLAGE DE PROTEINES TAU INDUIT PAR L'HYPERPHOSPHORYLATION GLOBALE DES REGIONS BORDANT LES DOMAINES DE LIAISON AUX MICROTUBULES.....	39
FIGURE 13 : LE « CODE BARRE » DES TAUOPATHIES ET LEUR CLASSIFICATION.....	40
FIGURE 14 : RAT SPRAGUE-DAWLEY, RAT DE LABORATOIRE.	43
FIGURE 15 : SINGES MODELES ANIMAUX DE LA MA.....	46
FIGURE 16 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES DE L'APP ET DE TAU D'ESPECES VERTEBREES ET INVERTEBREES.....	47
FIGURE 17 : SOURIS TRANSGENIQUES REPRODUISANT LES PLAQUES SENILES ET/OU LES CORPS NEUROFIBRILLAIRES.).....	50
FIGURE 18 : RESUME DES ROLES PATHOGENETIQUES POSSIBLES DE GENES CANDIDATS DES FORMES FAMILIALES PRECOCES DE MA... ..	50
FIGURE 19 : MUTATIONS DE L'APP A L'ORIGINE DE FORMES FAMILIALES DE LA MA UTILISEES CHEZ LES MODELES TRANSGENIQUES.. ..	51
FIGURE 20 : PLAQUES AMYLOÏDES REPRESENTATIVES D'UNE SOURIS APP23 ET D'UN CERVEAU HUMAIN ATTEINT DE MA VISUALISEES A L'AIDE D'UNE COLORATION A LA THIOFLAVINE S.	52
FIGURE 21 : LE TEST DE LA PISCINE DE MORRIS EVALUE LA MEMOIRE SPATIALE.....	65
FIGURE 22 : LE LABYRINTHE RADIAL MESURE LA MEMOIRE DE TRAVAIL.	67
FIGURE 23 : STRUCTURE DU DOMAINE SH3 DE FYN SE LIANT A TAU 215-225.	70
FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TRANSFERT DE CHOLESTEROL ENTRE ASTROCYTES ET NEURONES.	72
FIGURE 25 : A : SEQUENCE AMINEE DE L'ISOFORME HUMAINE TAU 46.	74
FIGURE 26 : TEST DE PREHENSION POSITIF CHEZ UNE SOURIS TRANSGENIQUE DE 10 MOIS DE LA LIGNEE 30 (THY-TAU30) PRESENTANT UNE PARALYSIE DES POSTERIEURS, UNE SOURIS DE LA LIGNEE 22 (THY-TAU22) ET UNE SOURIS SAUVAGE (WT).....	74
FIGURE 27 : ACCUMULATION DE PROTEINE TAU PATHOLOGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE CHEZ DES SOURIS THY-TAU22 DE 12 MOIS (B) COMPAREES A DES SOURIS SAUVAGES (A).	75

FIGURE 28 : ACCUMULATION DE PROTEINE TAU PATHOLOGIQUE DANS LA REGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE CHEZ DES SOURIS THY-TAU22 DE 12 MOIS (E ET F) COMPAREES A UNE SOURIS SAUVAGE (C).	75
FIGURE 29 : APPRENTISSAGE RETARDE ET MEMOIRE DIMINUEE CHEZ LES SOURIS THY-TAU22.	76
FIGURE 30 : PLASMIDE PAAV5/PGK (CYPWT).	78
FIGURE 31 : SCHEMA D'UNE COUPE SAGITTALE D'UN CERVEAU DE SOURIS.	80
FIGURE 32 : VUE DORSALE D'UN CRANE DE RAT ET LOCALISATION DU BREGMA.	81
FIGURE 33 : VUE PANORAMIQUE (360°) DES INDICES VISUELS ENVIRONNANT LA PISCINE.	81
FIGURE 34 : SOURIS DANS LA PISCINE DE MORRIS NAGEANT ET EN ATTENTE SUR LA PLATE-FORME.	82
FIGURE 35 : SCHEMATISATION DE L'ENREGISTREMENT VIDEO LORS DE LA PHASE D'APPRENTISSAGE D'UNE SOURIS LORS DE SON PREMIER ET DERNIER JOUR D'ENTRAINEMENT.	82
FIGURE 36 : SCHEMATISATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE POUR LES PHASES D'APPRENTISSAGE SPATIAL ET DE RETENTION DU TEST DE LA PISCINE DE MORRIS.	83
FIGURE 37 : CONFIGURATION DU TEST DES CADRANS.	83
FIGURE 38 : GENOTYPAGE DE SOURIS THY-TAU22 ET LITTERMATES.	88
FIGURE 39 : GRAPHIQUES PRESENTANT L'APPRENTISSAGE ET LE CRITERE DE REUSSITE POUR 60 SECONDES DES SOURIS LITTERMATES ET THY-TAU22 EN FONCTION DU JOUR D'ENTRAINEMENT.	89
FIGURE 40 : RESULTATS DU TEST DE RETENTION EFFECTUEE PAR LES SOURIS LITTERMATES ET LES THY-TAU22.	90
FIGURE 41 : PROFIL DE MIGRATION D'ECHANTILLONS D'ARN.	90
FIGURE 42 : SCHEMATISATION D'UNE COUPE SAGITTALE D'HIPPOCAMPE MURIN TIREE DE L'ATLAS ALLEN.	91
FIGURE 43 : EXPRESSION REPRESENTATIVE DE CYP46A1MUTE DANS L'HIPPOCAMPE D'UNE SOURIS THY-TAU 22 INJECTEE AVEC LE VECTEUR AAV-CYP MUTE.	92
FIGURE 44 : EXPRESSION REPRESENTATIVE DE CYP46A1WT DANS L'HIPPOCAMPE D'UNE SOURIS THY-TAU 22 INJECTEE AVEC LE VECTEUR AAV-CYP WT.	92
FIGURE 45 : MARQUAGE AT100 PERMETTANT DE VISUALISER LA PHOSPHORYLATION ANORMALE DE TAU EN COUPE SAGITTALE AU NIVEAU DE L'HIPPOCAMPE DANS LE MODELE MURIN THY-TAU22 (B) ET CHEZ DEUX CONTROLES NEGATIFS (A)	93
FIGURE 46 : A : REPRESENTATION SCHEMATIQUE, SUR LA PROTEINE TAU, DE LA LOCALISATION DES DIFFERENTS ANTICORPS PRIMAIRES. B : WESTERN BLOTS REALISES AVEC LES ANTICORPS CTER, AT100 ET PS422 SUR LES HIPPOCAMPES DES SOURIS THY-TAU22 TRAITEES AVEC LE VECTEUR CYP WT (N=5) ET LE VECTEUR AAV-CYP MUTE (N=2).	94
FIGURE 47 : HISTOGRAMMES REPRESENTANT LA QUANTITE DE PROTEINE TAU TOTALE AINSI QUE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU POUR LES EPITOPES CTER, AT100 ET PS422 CHEZ LES SOURIS THY-TAU22 TRAITEES AVEC LES VECTEURS AAV-CYP WT ET AAV- CYP MUTE.	95

TABLEAUX

TABLEAU 1 : CRITERES DU NINCDS-ADRDA POUR LE DIAGNOSTIC CLINIQUE DE LA MA.	31
TABLEAU 2 : STADES DE LA CLASSIFICATION DE BRAAK ET BRAAK (1991) SELON LA DENSITE ET LA DISTRIBUTION DES INCLUSIONS NEUROFIBRILLAIRES.	35

TABLEAU 3 : SOURIS TRANSGENIQUES APP ET APP/PS1 ET LEURS CARACTERISTIQUES.	53
TABLEAU 4 : MODELES DE SOURIS TRANSGENIQUES DE TAUOPATHIE COMMUNEMENT UTILISES.....	55
TABLEAU 5 : SOURIS TRANSGENIQUES TAU ET APP/TAU ET LEURS CARACTERISTIQUES	57
TABLEAU 6 : TESTS COMPORTEMENTAUX PERMETTANT L'EVALUATION DE L'APPRENTISSAGE ET DES PROCESSUS DE MEMORISATION (ACQUISITION, CONSOLIDATION ET RETENTION) CHEZ DES MODELES ANIMAUX	64
TABLEAU 7 : TESTS COMPORTEMENTAUX PERMETTANT L'EVALUATION DES SIGNES PSYCHOLOGIQUES ET DES SYMPTOMES DE DEMENCE LIES A LA MA CHEZ DES MODELES ANIMAUX.....	68
TABLEAU 8 : EXPRESSION DES GENES TAU ET CYP HUMAINS ET MURINS CHEZ DES SOURIS LITTERMATES NON INJECTEES ET CHEZ LES SOURIS THY-TAU22.	91

ABREVIATIONS

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale

AAV : Vecteur viral Adéno-Associé

A β : Peptide Amyloïde- β

ABCA : ATP-binding cassette

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMPK : Kinase activée par l'AMP (Adénosine MonoPhosphate)

ApoE : Apolipoprotéine E

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BET : Bromure d'Ethidium

Ct : Cycle Threshold

DAB : DiAminoBenzidine

DFT : Démence Fronto-Temporale

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire

dNTP : désoxy Nucléotide Triphosphate

DTT : DiThioThreitol

EURODEM : European Community Concerted Action on the Epidemiology and Prevention of Dementia Group

GAPDH : GlycérAldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase

KO : Knock-Out

LPS : LipoPolySaccharide

LTP : Long-Term Potentiation

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPT : Microtubule Associated Protein Tau

NIA-RI : National Institute on Aging and Reagan Institute

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NPC : Niemann-Pick disease type C

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OPEPS : Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé

Paquid : Personnes âgées Quid

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PFA : Paraformaldéhyde

RE : Réticulum Endoplasmique

RT-qPCR : Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction

SEM : Standard Error of the Mean

SNC : Système Nerveux Central

SORL1 : Neuronal apolipoprotein E receptor

TBP : TATA Box binding Protein

TNT : Tris NaCl Tween

Introduction

1.1. La maladie d'Alzheimer

En 1907, Aloïs Alzheimer (1864-1915), médecin psychiatre, neurologue et neuropathologiste allemand, a décrit le cas d'une femme de 51 ans, Madame Auguste D, présentant une détérioration de ses capacités mnésiques relativement rapide accompagnée de troubles psychiatriques. Ce cas clinique sera à l'origine de la détermination et de la caractérisation d'une nouvelle pathologie du système nerveux central (SNC) : la maladie d'Alzheimer (MA). En effet, Madame Auguste D mourut 4 ans après le début de l'étude de son cas et l'analyse post-mortem de son cerveau permit de mettre en évidence la présence de deux lésions singulières : les plaques amyloïdes et les corps neurofibrillaires (Alzheimer, Stelzmann et al. 1995).

La MA est, aujourd'hui, caractérisée par une détérioration neurologique continue engendrant une démence sénile accompagnée de caractéristiques anatomo-pathologiques comprenant la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau, de dégénérescence neurofibrillaire (DNF) et d'une atrophie cérébrale régionale caractéristique.

1.1.1. Epidémiologie

A l'heure actuelle, le nombre de sujets atteints de démence est sous-estimé. L'absence d'indicateur sanitaire fiable et de registre permettant un recensement exhaustif des cas ainsi que les difficultés pour établir un diagnostic précoce rendent les estimations sur le nombre de cas de MA difficiles (Nelson, Braak et al. 2009).

En Europe, la prévalence de la MA chez les sujets de plus de 65 ans est d'environ 6,4 % (EURODEM). L'âge constitue, de loin, le principal facteur de risque de la MA. L'incidence de la MA passe de 7/5000 personnes/année entre 65 et 69 ans à 49/1000 personnes/année après 90 ans.

En France, l'étude Paquid est la principale source de données sur la prévalence des démences en France pour des individus de plus de 65 ans. La prévalence en 1989, chez les plus de 75 ans, était égale à 8 %. Après 10 ans de suivi, ce taux est passé à 18 %. Cette augmentation est liée principalement à l'amélioration du diagnostic ainsi qu'à l'augmentation de l'espérance de vie. Cependant, le nombre de cas semble doubler tous les 20 ans (**Figure 1**).

Toujours en France, à partir du recensement de 2004, le nombre de cas de démence est estimé à 850 000. La MA représente environ 70 % de ces cas soit 600 000 cas. Les femmes sont trois fois plus touchées que les hommes, observation à contrebalancer avec l'espérance de vie des femmes qui est supérieure à celle des hommes.

L'augmentation du nombre d'individus atteints de la MA entraîne une forte augmentation des coûts liés à cette maladie. En effet, en France, le coût de la maladie d'Alzheimer a fait l'objet de plusieurs estimations qui permettent de souligner le problème économique posé par les soins à donner à tous les patients atteints. D'après l'OCDE, un patient en 2000 coûtait au total 19 581 €. L'OPEPS (2005), quant à lui, estime le coût annuel moyen par patient à 22 099 €, dont 5 791 € de dépenses médicales et 16 307 € de dépenses médico-sociales

(dont 55 % à la charge des familles). Enfin, c'est une maladie ruineuse pour le patient dont le coût est notamment au dessus de la retraite moyenne des femmes.

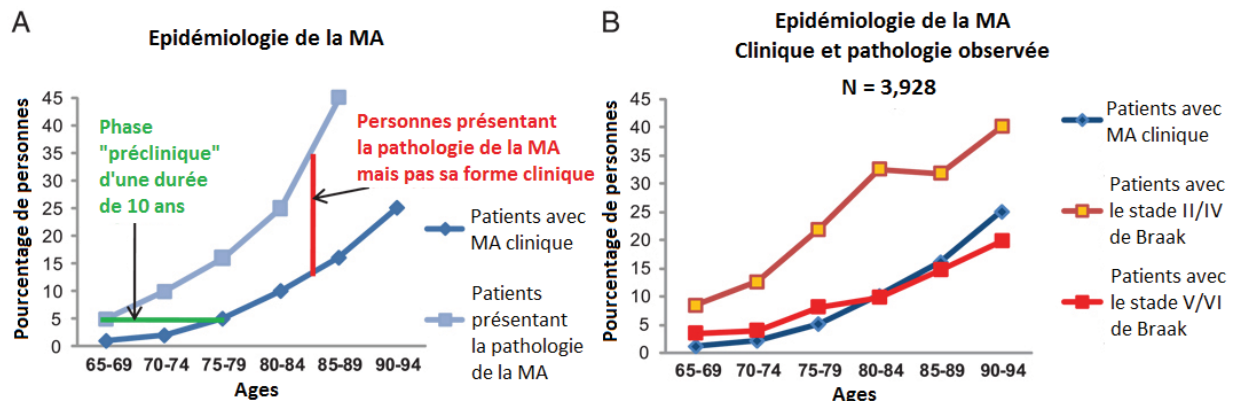


Figure 1 : A : L'épidémiologie de la MA et la durée de son processus prédisent que de nombreuses personnes présentant la pathologie de la MA meurent avant le début de la démence. La phase préclinique de la MA a été évaluée grâce à différentes études épidémiologiques sur 10 ans.

B : Des données empiriques confirment le fait que de nombreux individus, mourant d'une autre cause que de la MA, présentent une pathologie de type MA. Ces données empiriques ont été obtenues à partir de 3928 cas âgés de 65 à 94 ans. Il faut noter que le stade III/IV de Braak correspond à une probabilité moyenne de présenter la maladie d'après le NIA-RI (Nelson, Braak et al. 2009).

1.1.2. Clinique

Le diagnostic de la MA repose sur un tableau clinique qui associe la présence de troubles de la mémoire antérograde (ou amnésie de fixation) à la détérioration d'au moins un autre domaine cognitif, comme par exemple des troubles des activités sociales ou occupationnelles (**Tableau 1**) (Castellani, Rolston et al. 2010). Cependant, seule l'analyse anatomo-pathologique post-mortem permet le diagnostic de certitude.

- I. La MA est caractérisée par un déclin progressif et, à terme, une perte de multiples fonctions cognitives, incluant à la fois des troubles de la mémoire, des troubles de la capacité d'apprentissage de nouvelles informations ou du rappel d'informations préalablement acquises et au moins la perte d'une des capacités suivantes :
 - Perte de la capacité de compréhension des mots (aphasie),
 - Perte de la capacité de réalisation de tâches complexes impliquant la coordination musculaire (apraxie),
 - Perte de la capacité de reconnaître et d'utiliser des objets familiers (agnosie),
 - Perte de la capacité de planifier, d'organiser et d'exécuter des activités normales.
- II. Les problèmes évoqués dans le « I. » représentent un déclin important des capacités antérieures de la personne engendrant de sérieux problèmes dans la vie de tous les jours. Ce déclin commence doucement et de façon graduelle puis devient de plus en plus sévère.

- III. Les problèmes évoqués dans le « I. » ne sont pas dus à d'autres conditions qui entraînent un déclin cognitif progressif (tumeur cérébrale, maladie de Parkinson, etc.) ni à d'autres conditions qui engendrent une démence (hypothyroïdisme, infection par le VIH, etc.), ni à un épisode délirant ou encore à une autre maladie mentale telle que la dépression ou la schizophrénie.

Tableau 1 : Critères du NINCDS-ADRDA pour le diagnostic clinique de la MA (Castellani, Rolston et al. 2010).

La MA progresse de façon continue en dépit des tentatives de thérapies palliatives disponibles. L'autonomie des individus est progressivement perdue. La plupart de ces patients décèdent de pneumonie, après une longue période de déchéance.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune thérapie curative de la MA, d'où l'urgence de développer des stratégies thérapeutiques innovantes afin de pallier cet enjeu socio-économique majeur.

1.1.3. Neuropathologie

1.1.3.1. Aspect macroscopique

Les cerveaux de patients atteints de MA présentent une atrophie à prédominance fronto-temporale. Celle-ci est liée à une perte de volume neuronal importante entraînant une réduction du ruban cortical ainsi que des circonvolutions cérébrales (**Figure 2**).

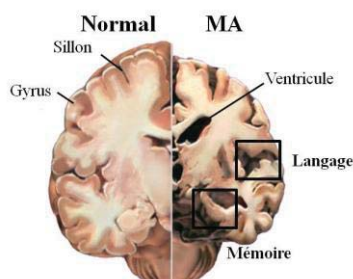


Figure 2 : Coupe coronale d'un hémisphère de cerveau humain sain et de cerveau d'un patient atteint de la MA.

<http://www.alz.org/brain/09.asp>

1.1.3.2. Aspects microscopiques

Les lésions cérébrales caractéristiques de la MA sont les dépôts amyloïdes et la DNF.

Les premières lésions pathologiques apparaissent dans les régions médio-temporales du cerveau notamment l'amygdale, le subiculum, la Corne d'Ammon 1 (CA1) de l'hippocampe, le cortex entorhinal et les régions trans-entorhinales (**Figure 3**, **Figure 4**). L'amygdale présente, en quantité importante, des dépôts amyloïdes ainsi que de la DNF. Cette dernière se localise majoritairement dans l'hippocampe et le cortex tandis que les dépôts amyloïdes se concentrent dans le cortex (Castellani, Rolston et al. 2010).

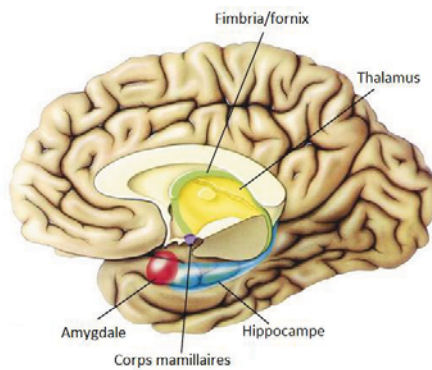


Figure 3 : Coupe sagittale présentant l'hippocampe en situation anatomique au sein du lobe temporal médian.
<http://www.jle.com/en/revues/medecine/epi/e-docs/00/04/1D/10/article.phtml?fichier=images.htm>

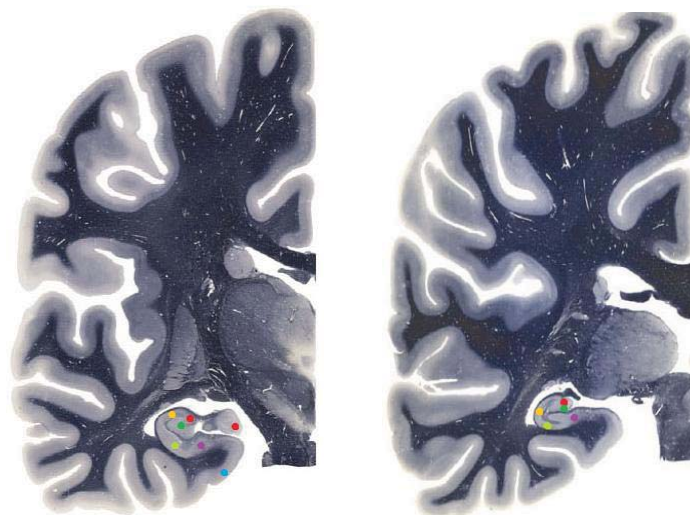


Figure 4 : Coupes coronales d'un hémisphère cérébral humain : **Cortex entorhinal** ; **Gyrus denté** ; **Couche CA3 de l'hippocampe**, **Couche CA2 de l'hippocampe** ; **Couche CA1 de l'hippocampe** ; **Subiculum**.
 A gauche à 19,9 mm du bregma ; à droite à 31,9 mm.
 Atlas of the Human Brain - www.thehumanbrain.info

La perte de neurones pyramidaux ou d'indicateurs de connectivité neuronale, telle que la perte synaptique (**Figure 5**) ou des altérations neuritiques, semble être mieux corrélée avec le déclin des fonctions cognitives. Ces anomalies synaptiques et neuritiques semblent être liées à des modifications importantes au niveau membranaire (fluidité, constitution, intégrité et flux calciques altérés) dues, en partie, à la toxicité du peptide A β (voir ci-après), à des déficiences du transport axonal ainsi qu'au stress oxydatif.

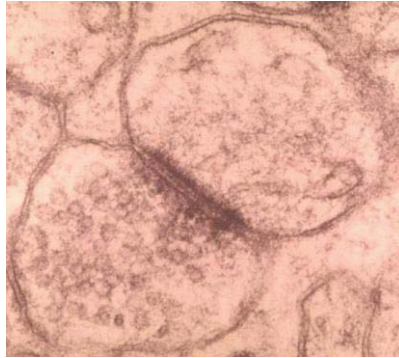


Figure 5 : Microscopie électronique d'une synapse. Les vésicules présynaptiques et le complexe jonctionnel dense sont visibles. L'étude des synapses dans les maladies neurodégénératives n'a qu'une fonction informative et non un rôle dans le diagnostic neuropathologique. Cependant, il est maintenant connu qu'il existe une bonne corrélation entre la perte synaptique et la MA (Castellani, Rolston et al. 2010).

1.1.3.2.1. Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont des agrégats extracellulaires de peptides amyloïdes- β ($A\beta$) organisés en feuillets β plissés (**Figure 7**). L'APP (Amyloid Precursor Protein) est le précurseur physiologique de ce peptide. Deux protéases, la β -sécrétase (BACE) et la γ -sécrétase, clivent l'APP en peptide $A\beta$ (**Figure 6**). La γ -sécrétase peut cliver l'APP à deux endroits, il existe donc deux formes majoritaires de peptides $A\beta$: l' $A\beta_{40}$ qui comporte 40 acides aminés et l' $A\beta_{42}$ qui en comporte 42.

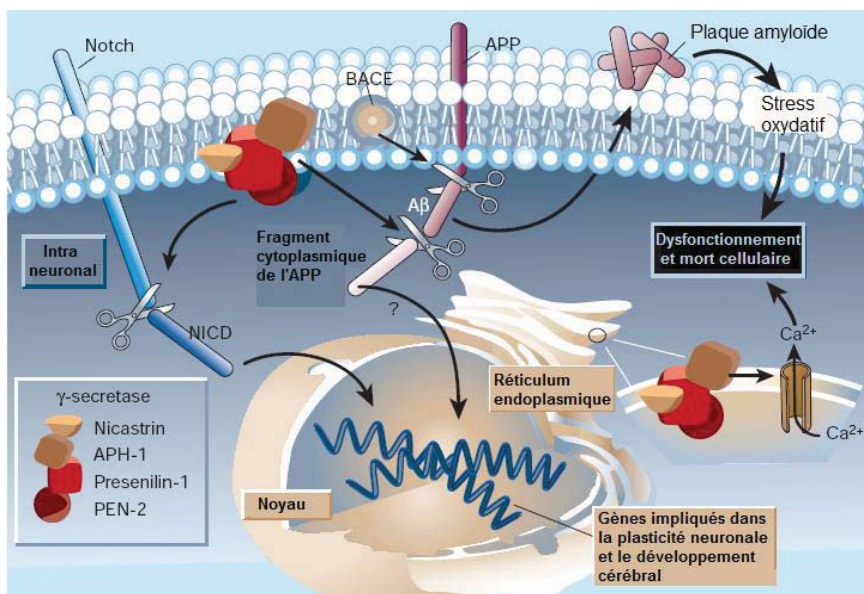


Figure 6 : La γ -sécrétase fonctionnelle est en réalité un complexe formé de la préséniline 1, la nicastrine, l'APH-1 et la PEN-2 (PSEN2). Ce complexe se situe dans la membrane cytoplasmique et le réticulum endoplasmique (RE) des neurones. Il clive Notch ce qui génère le fragment NICD qui migre jusqu'au noyau et régule l'expression de gènes impliqués dans la plasticité neuronale et le développement cérébral. Il génère également le peptide $A\beta$ lorsque l'APP a été préalablement clivé par la β -sécrétase (BACE). La γ -sécrétase libère le peptide $A\beta$ ainsi qu'un fragment cytoplasmique de l'APP qui peut migrer jusqu'au noyau et réguler l'expression de différents gènes.

Des mutations de la préséniline-1 (PSEN 1), conduisant à une forme précoce de la MA, entraînent une augmentation de l'activité de la γ -sécrétase et de la production de peptide $A\beta$ et perturbent également l'équilibre calcique du RE. La dégénérescence neuronale qui en résulte est probablement induite à la fois par les plaques amyloïdes mais également par la modification de l'équilibre calcique (Mattson 2003).

Dans les dépôts amyloïdes immatures (ou diffus), on trouve majoritairement le peptide A β ₄₂. Le peptide A β ₄₀, quant à lui, est localisé principalement dans les dépôts matures compacts intra-parenchymateux ainsi qu'au niveau des vaisseaux (angiopathie amyloïde).

La composante amyloïde est un élément physiopathologique important de la maladie d'Alzheimer. Les formes héréditaires familiales associées à des mutations du gène APP (mutation ponctuelle, duplication) et de deux sous unités (présénilines 1 et 2) du complexe γ -secrétase sont un fort argument en ce sens (voir paragraphe 1.2.1.1.).

Le gène de l'APP est localisé sur le chromosome 21 (21q21.2-3) et s'exprime dans de nombreux tissus et cellules tels que l'endothélium, la glie et les neurones du cerveau. Le pré-ARNm est alternativement épissé pour produire trois isoformes majeures : l'APP₇₇₀, l'APP₇₅₁ et l'APP₆₉₅. Le cerveau semble produire majoritairement l'isoforme à 695 acides aminés. C'est pourquoi cette isoforme a été très étudiée dans la recherche contre la MA. Cependant, en culture cellulaire et dans l'hippocampe de rat, les deux autres isoformes semblent prédominantes dans les astrocytes (Turner, O'Connor et al. 2003).

1.1.3.2.2. La Dégénérescence NeuroFibrillaire

La protéine Tau est une protéine associée aux microtubules, fortement exprimée dans les neurones, qui se situe principalement dans les axones. Dans la MA, elle s'accumule dans le soma des neurones sous la formes de filaments appariés en hélice, nommés enchevêtrements neurofibrillaires. Ces agrégats intra-cytoplasmiques de protéines Tau ont les mêmes propriétés physico-chimiques que les dépôts amyloïdes et sont donc visualisables par les mêmes techniques (**Figure 7**).

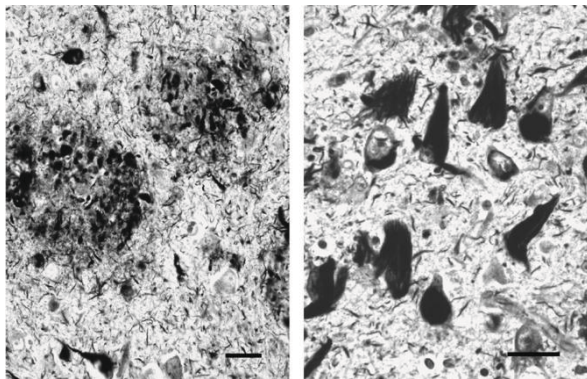


Figure 7 : Lésions histologiques caractéristiques de la MA vues à l'aide d'une coloration à l'argent (échelle = 25 μ m) (Nelson, Braak et al. 2009).

A gauche : Plaques séniles (agrégats de peptides A β).
A droite : Corps neurofibrillaires.

La formation des enchevêtrements neurofibrillaires suit une évolution caractéristique :

- Le stade « pré-corps » où le neurone a une allure normale mais dont le cytoplasme contient des protéines Tau hyperphosphorylées.
- Le stade « intra-corps » (**Figure 8**) où le neurone contient de nombreuses structures filamenteuses dans son cytoplasme pouvant repousser le noyau en périphérie. Les neurites sont déstructurés et le neurone a perdu sa polarisation.

- Le stade « corps fantôme » qui correspond au stade d'évolution ultime du neurone en dégénérescence.

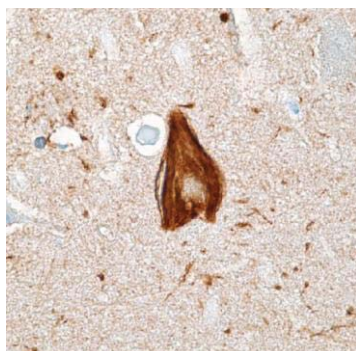


Figure 8 : Corps neurofibrillaire (AT8) (Castellani, Rolston et al. 2010).

Braak et Braak ont montré que la DNF se développe de façon séquentielle dans le cerveau. Ils ont ainsi distingué six stades (de I à VI) qu'ils ont associés au fonctionnement cognitif (**Tableau 2**).

Au stade entorhinal, les dégénérescences neurofibrillaires apparaissent d'abord dans la région transentorhinale (la région intermédiaire entre le cortex entorhinal et l'isocortex temporal adjacent) (stade I). Puis elles envahissent la couche II du cortex entorhinal et le secteur CA1 de l'hippocampe (stade II).

Au stade limbique, le nombre de dégénérescences neurofibrillaires augmente dans les régions déjà affectées et elles s'étendent à l'amygdale et au néocortex temporal adjacent (stade III) puis au subiculum (stade IV).

Finalement, au stade néocortical, l'augmentation du nombre de dégénérescences se poursuit dans les régions déjà affectées et elles se développent dans le néocortex associatif (stade V) puis dans le néocortex sensoriel et moteur (stade VI).

Stade anatomique	Stade de Braak	Pathologie Tau médio-temporale	Pathologie Tau isocorticale
Transentorhinal	I-II	Limitée aux régions transentorhinale et entorhinale	Faible
Limbique	III-IV	Localisée aux régions transentorhinale et entorhinale et à l'hippocampe	Modérée
Isocortical	V-VI	Région médio-temporale dans sa quasi totalité	Avancée

Tableau 2 : Stades de la classification de Braak et Braak (1991) selon la densité et la distribution des inclusions neurofibrillaires (Braak and Braak 1991).

Il semble donc que la composante Tau de la MA soit responsable du tableau clinique observé chez les patients (Braak and Braak 1991).

1.1.4. La composante Tau dans la maladie d'Alzheimer

1.1.4.1. La protéine Tau

La protéine Tau est une **protéine associée aux microtubules et normalement phosphorylée** (2 à 3 mol de phosphates par mol de protéines). Il existe six isoformes de Tau issues du gène *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau) localisé sur le chromosome 17.

Celles-ci diffèrent par l'absence ou la présence d'un ou de deux inserts de 29 acides aminés dans la région N-terminale et par la présence de 3 ou de 4 régions répétées dans la région C-terminale (3R ou 4R) qui correspondent aux domaines de liaison aux microtubules (**Figure 9**) (Buee, Bussiere et al. 2000).

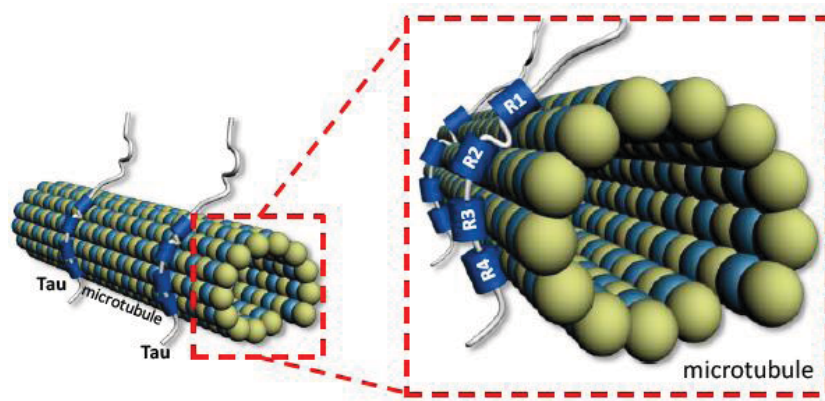


Figure 9 : Interaction Tau et microtubule (Alexis Bretteville, thèse universitaire, Lille, 2007).

Le gène *MAPT* humain contient 16 exons. L'ARN messager a quant à lui 13 exons ; les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas transcrits. Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13 sont constitutifs tandis que les exons 2, 3 et 10 sont épissés alternativement, ce qui conduit à 6 ARNm différents à l'origine des six isoformes de Tau (**Figure 10**). Celles-ci diffèrent par l'absence ou la présence d'un ou de deux inserts de 29 acides aminés codés par l'exon 2 (en jaune) et 3 (en vert) dans la région N-terminale et par la présence de 3 ou de 4 régions répétées (en noir) dans la région C-terminale (3R ou 4R) (**Figure 10**). Le 4^{ème} domaine de liaison aux microtubules est codé par l'exon 10 (en rayé).

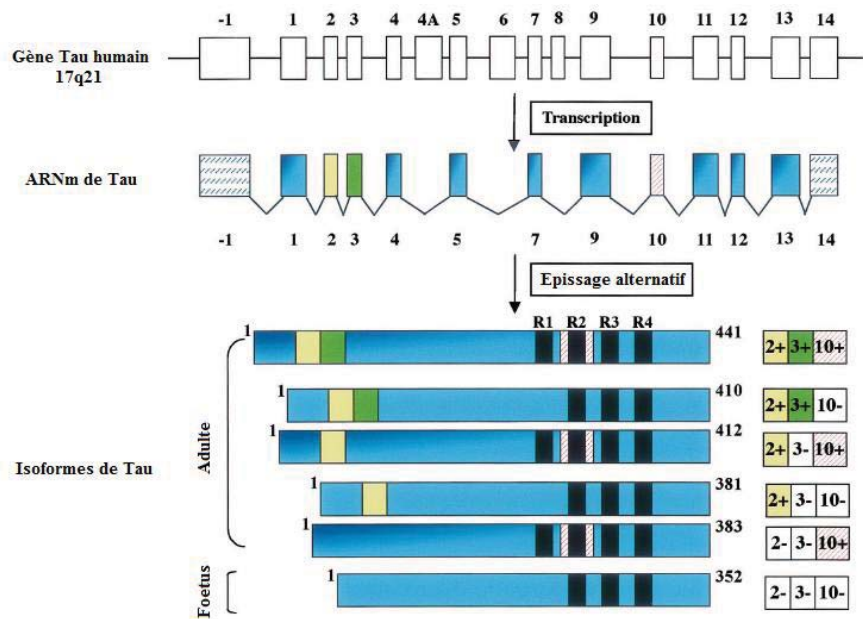


Figure 10 : Représentation schématique du gène MAPT (Tau) humain, de son ARN messager et de ses six isoformes dans le système nerveux central. Les six isoformes de Tau chez l'adulte sont : l'isoforme 2+3+10+ comprenant 441 acides aminés (aa), la 2+3+10- de 410 aa, la 2+3-10+ de 412 aa, la 2+3-10- de 381 aa et la 2-3-10+ de 383 aa. L'isoforme la plus courte, composée de 352 aa, est retrouvée seulement dans le cerveau fœtal (Buee, Bussiere et al. 2000).

1.1.4.2. La pathologie Tau

1.1.4.2.1. Mécanisme général

Chez des patients atteints de la MA, les niveaux de Tau intracérébrale sont 4 à 8 fois plus élevés que chez des individus sains. Cette augmentation est due aux formes pathologiques de Tau (Khatoun, Grundke-Iqbal et al. 1992). Ces dernières sont présentes dans les corps neurofibrillaires et sont également retrouvées dans le cytosol. Leur liaison aux microtubules est diminuée, ce qui conduit à la déstabilisation de ces derniers. Lorsque les formes pathologiques de Tau sont cytosoliques, elles n'interagissent pas avec les microtubules mais contribuent à la séquestration des Tau non pathologiques. De plus, elles inhibent la liaison de Tau aux microtubules et cassent les pré-assemblages qui avaient pu se former (Alonso, Grundke-Iqbal et al. 1996; Alonso, Grundke-Iqbal et al. 1997). **Ces protéines Tau pathologiques finissent par s'agréger en filaments.**

L'agrégation en filaments permettrait de diminuer la séquestration de protéines Tau saines et serait ainsi, au départ, un moyen d'auto-défense des neurones malades. La perte de la fonctionnalité de Tau, qui est nécessaire pour la maintenance du réseau microtubulaire, participe à la neurodégénérescence (Iqbal, Alonso Adel et al. 2005).

La progression de la DNF est mieux corrélée à la progression clinique de la MA que celle des dépôts amyloïdes (Castellani, Rolston et al. 2010).

1.1.4.2.2. Hyperphosphorylation et phosphorylation anormale de Tau

Les formes pathologiques de Tau sont constituées de protéines Tau à la fois :

- **Hyperphosphorylées** : des épitopes normalement phosphorylés sont hyperphosphorylés,

- **Anormalement phosphorylées** : des épitopes normalement non phosphorylés le deviennent.

L'hyperphosphorylation globale de Tau, c'est-à-dire son hyperphosphorylation et sa phosphorylation anormale, serait liée à un changement conformationnel de la protéine qui deviendrait un substrat meilleur pour la phosphorylation et moins bon pour la déphosphorylation.

L'**hyperphosphorylation de Tau** concerne au moins 25 sites. Ces sites correspondent notamment aux anticorps AT8, AT270, 12E8 et AT180 (**Figure 11**).

La **phosphorylation anormale de Tau** n'est jamais retrouvée chez des sujets sains. Les épitopes correspondent aux Ser/Thr212 et Ser214 (AT100), à la Thr231 (TG3) ainsi qu'à la Ser422 (pS422) de Tau (**Figure 11**).

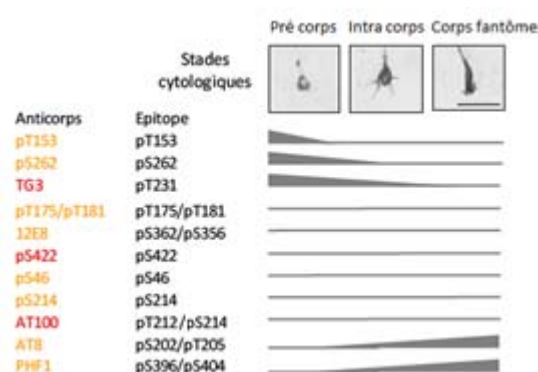


Figure 11 : Séquence d'apparition des sites de phosphorylation de Tau au cours des stades d'évolution cytotogique de la DNF (Alexis Bretteville, thèse universitaire, Lille, 2007).

Les protéines régulant la phosphorylation de Tau sont principalement les kinases GSK-3 β et Cdk5 qui voient leur activité augmentée et certaines phosphatases telles que PP2A dont l'activité est alors diminuée. La perturbation de ces régulations entraînera une hyperphosphorylation globale de Tau.

1.1.4.2.3. Auto-assemblage de Tau en filaments

Dans les corps neurofibrillaires, Tau est anormalement tronquée, à la fois au niveau de la Glu391 et de la Ser421 (Novak, Jakes et al. 1991; Gamblin, Chen et al. 2003).

Or, la région C-terminale de Tau, qui borde les domaines associés aux microtubules, permet l'inhibition de son auto-assemblage en filaments. De plus, l'hyperphosphorylation des régions bordant les domaines de liaison aux microtubules entraîne leur acidification. Une fois acidifiées, elles ne sont plus capables d'empêcher l'auto-assemblage de la protéine, celle-ci ayant subi un changement de conformation (**Figure 12**).

Donc, l'hyperphosphorylation globale et/ou la troncation de la région C-terminale pourrait conduire à l'auto-assemblage des protéines Tau.

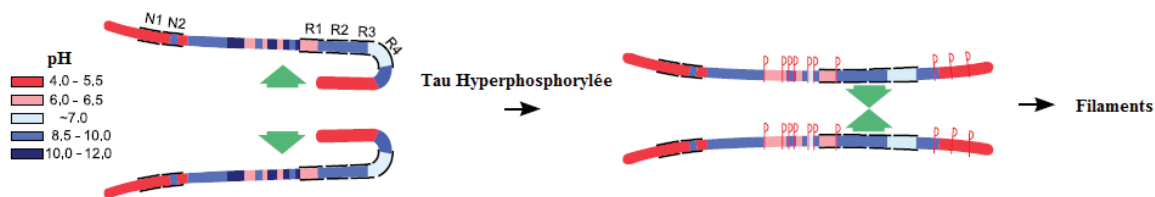


Figure 12 : Schéma hypothétique de l'auto-assemblage de protéines Tau induit par l'hyperphosphorylation globale des régions bordant les domaines de liaison aux microtubules. Ces régions deviennent alors acides, ce qui permet aux domaines de liaison aux microtubules de s'associer les uns aux autres (Iqbal, Alonso Adel et al. 2005).

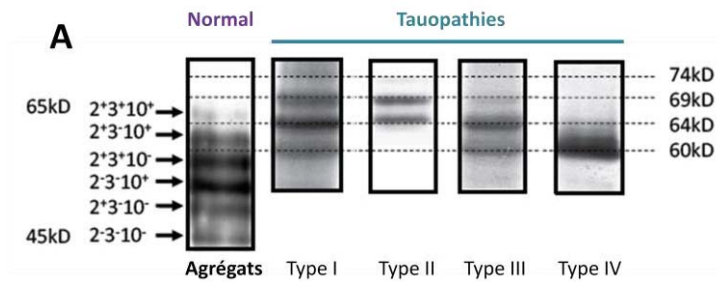
1.1.4.2.4. Les Tauopathies

Un certain nombre de démences neurodégénératives, se caractérisant par des agrégats intracellulaires de protéines Tau anormalement phosphorylées, ont été regroupées sous le terme de Tauopathies.

D'un point de vue histopathologique, ces agrégats peuvent prendre des aspects histologiques différents suivant les pathologies. Ainsi, on distinguera : la DNF observée dans la maladie d'Alzheimer, les corps de Pick de la maladie de Pick, ou bien encore les touffes gliales observées dans la paralysie supranucléaire progressive.

D'un point de vue biochimique, ces Tauopathies peuvent être également subdivisées en 5 classes distinctes en raison de l'implication de différentes isoformes de Tau dans la formation des agrégats. Cette classification est rendue possible par la caractérisation du profil électrophorétique des protéines Tau agrégées et anormalement phosphorylées. Ainsi, par comparaison à un profil normal présentant les 6 isoformes de Tau, on distingue cinq classes de Tauopathies (**Figure 13**).

La MA est une Tauopathie de classe 1. Cette classe se caractérise par un profil électrophorétique présentant un triplet de protéines Tau à 60, 64 et 69 kDa et un variant très mineur à 74 kDa. Ce regroupement des 6 isoformes de Tau sous la forme d'un triplet est dû à la modification de la masse moléculaire apparente des isoformes de Tau provoquée par la dérégulation de leur état de phosphorylation. Ainsi, la bande à 60 kDa correspond à l'isoforme de Tau la plus courte ($2^{-}3^{-}10^{-}$), celle de 64 kDa aux isoformes $2^{-}3^{-}10^{+}$ et $2^{+}3^{-}10^{-}$ et la bande à 69 kDa regroupe les isoformes $2^{+}3^{-}10^{+}$ et $2^{+}3^{+}10^{-}$. La bande mineure à 74kDa, quant à elle, correspond à l'isoforme de Tau la plus longue $2^{+}3^{+}10^{+}$.



B Cinq classes de tauopathies

Classe	Pathologies	Type d'agrégats
Classe 0	Démence frontale	Perte de l'expression de la protéine Tau
Classe 1	Age > 75 MA Complexe de l'île de Guam Maladie de Parkinson avec démence de type Guadeloupe Maladie de Niemann-Pick de type C Démence pugilistique Syndrome de Down DFTP-17	Type I : Triplet de Tau (60, 64 et 69 kD)
Classe 2	Dégénérescence Corticobasale Démence à grains argyrophile Paralysie supranucléaire progressive DFTP-17	Type II : Doublet de Tau (64 et 69 kD)
Classe 3	Maladie de Pick DFTP-17	Type III : Doublet de Tau (60 et 64 kD)
Classe 4	Dystrophie Myotonique I et II	Type IV : Tau 60 kD

Figure 13 : Le « code barre » des Tauopathies et leur classification.
 A : Tissus de cerveaux humains de patients atteints de différentes Tauopathies ayant été séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide et protéines Tau pathologiques révélées par Western blot à l'aide d'anticorps anti-Tau phospho-dépendants. Quatre profils électrophorétiques de protéines Tau pathologiques sont illustrés. Les bandes de Tau pathologiques sont retrouvées à 60, 64, 69 et 74 kDa correspondant aux protéines Tau retrouvées dans les agrégats.
 B : Classification de troubles neurologiques pour lesquels un profil de protéines Tau pathologiques a été identifié. Il existe cinq classes comprenant un seul ou plusieurs troubles neurologiques. La classe 0 comprend une seule pathologie caractérisée par l'absence d'expression de Tau. Cependant, de récentes découvertes, ayant permis de mettre en évidence l'implication d'autres protéines dans la pathologie, excluent cette démence du concept de Tauopathies. DFTP-17 : démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (Sergeant, Delacourte et al. 2005).

1.2. Animaux modèles de la maladie d'Alzheimer et de la démence fronto-temporale

1.2.1. Gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer chez l'homme

1.2.1.1. Formes familiales de la maladie d'Alzheimer

Ces formes ne représentent que 5 % des cas de maladie d'Alzheimer. Les gènes mutés impliqués sont le plus souvent dominants.

Le gène de l'APP est localisé sur le chromosome 21 (21q21.3). Des mutations de ce gène entraînent une augmentation de la quantité totale de peptides Aβ ou bien une augmentation sélective de la quantité de peptide Aβ₄₂. A l'heure actuelle, 20 mutations du gène de l'APP ont été répertoriées comme étant liées au

développement de la MA, celle-ci débutant alors entre 45 et 65 ans. Récemment, il a été montré que des duplications du locus de l'APP conduisent à une MA plus précoce présentant également une angiopathie congophilique amyloïde. Les mutations de l'APP représentent moins de 1 % des cas de MA.

Le gène codant pour la **préséniline 1** (PSEN1) est localisé sur le chromosome 14 (14q24.3). Plus de 150 mutations de ce gène ont été rapportées comme entraînant une MA familiale précoce. Les mutations du gène PSEN1 représentent environ 8 % des cas familiaux de MA, dont le début surviendrait entre 28 et 50 ans. Ces mutations conduisent généralement à une augmentation sélective du peptide A β ₄₂.

Le gène codant pour la **préséniline 2** (PSEN 2) est localisé sur le chromosome 1 (1q31-q42). PSEN2 est un homologue de PSEN1. A l'heure actuelle, 20 mutations ont été décrites (McGowan, Eriksen et al. 2006).

Les gènes PSEN1 et PSEN2 représentent 20 à 60 % des formes monogéniques de la MA.

Les mutations des gènes PSEN1 et PSEN2 affectent la concentration en peptide A β ₄₂. En effet, ces protéines font partie du complexe γ -sécrétase qui permet le clivage de l'APP conduisant à la formation de peptides A β .

Le gène **SORL1** est quant à lui impliqué dans des formes familiales tardives. SORL1 diminue l'interaction entre l'APP et la β -sécrétase. La concentration de SORL1 est réduite chez les patients atteints de MA (Ballard, Gauthier et al. 2011).

1.2.1.2. Formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer

Le gène codant pour l'**APOE** est localisé sur le chromosome 19 (19q13.2). L'allèle ϵ 4 augmente la susceptibilité à la MA débutant tardivement, présentant une faible pénétrance mais une incidence élevée. L'allèle ϵ 2 confère quant à lui un effet protecteur vis-à-vis de la maladie (McGowan, Eriksen et al. 2006). Les individus porteurs de deux allèles ϵ 4 présentent un risque 7 fois plus élevé de développer la maladie que ceux porteurs de deux allèles ϵ 3.

Le gène codant pour la protéine **Tau** est localisé sur le chromosome 17 (17q21.1). Des mutations de ce gène ne conduisent pas à la MA mais à différentes tauopathies telle que la démence fronto-temporale (DFT). Plus de 30 mutations ont été identifiées. Ces mutations conduisent à un dysfonctionnement de Tau suffisant pour induire une pathologie neurofibrillaire et une démence (McGowan, Eriksen et al. 2006). La pertinence de l'haplotype de Tau dans la MA n'est pas clair, mais une interaction a été rapportée entre les haplotypes de Tau et de GSK-3 β (Kwok, Loy et al. 2008). L'haplotype H1c de Tau est plus fréquent dans la MA (Haplotype H1c: rs1467967 = A, rs242557 = A, rs3785883 = G, rs2471738 = T, Intron 9 = inséré et rs7521 = G) (Myers, Kaleem et al. 2005).

D'autres gènes ont été identifiés comme étant des facteurs de risque de la maladie mais le risque associé est beaucoup moins élevé hormis pour le gène GSK3 β associé à une augmentation du risque 1,7 fois supérieure (Ballard, Gauthier et al. 2011).

1.2.2. Animaux modèles de la maladie d'Alzheimer

1.2.2.1. Utilité des animaux modèles

L'**espérance de vie** de la plupart des animaux modèles est considérablement plus courte que celle de l'homme. Cela permet de réduire le temps d'étude des séquelles observables liées à la maladie, sans oublier que, chez l'homme, l'âge est le principal facteur de risque de développer la MA. Si nous comptons uniquement sur les découvertes dans la compréhension et le traitement de la maladie au rythme du vieillissement chez l'homme, les espérances de traitement et de prévention seraient diminuées.

Les animaux modèles présentent également une **période de gestation** courte et une **prolificité élevée** ce qui facilite d'autant leur étude et permet d'évaluer la reproductibilité des expérimentations notamment. La drosophile est un modèle très prolifique qui présente une espérance de vie de deux à trois mois. Il est donc possible d'étudier les précurseurs génétiques et développementaux de la neurodégénérescence chez l'individu âgé sur plusieurs générations au cours d'une année. Les rongeurs présentent également ces caractéristiques et ont l'avantage d'être des Mammifères.

Les modèles animaux permettent de développer des moyens de recherche non applicables à l'homme. En effet, des études invasives ou présentant des risques élevés pour l'individu ainsi que les manipulations expérimentales réalisables chez les modèles animaux ne sont pas faisables chez l'homme. Les manipulations expérimentales chez les modèles animaux permettent de mettre en évidence et de mieux comprendre des phénomènes pathologiques qui ne peuvent être étudiés de manière non invasive chez l'homme. Les **contraintes éthique et légale sur l'expérimentation humaine** conduisent à utiliser des animaux modèles lorsque les alternatives à l'emploi de créatures vivantes, telles que les études *in vitro* et les simulations informatiques, ne sont pas suffisantes. Enfin, les modèles animaux sont un outil essentiel dans la **compréhension des mécanismes** et le **développement de traitements** (Woodruff-Pak 2008). Cependant, il faut garder en tête que les modèles animaux sont difficiles à standardiser.

1.2.2.2. Modèles non transgéniques

Les **rongeurs non-transgéniques** représentent des modèles animaux de la MA peu pertinents. Par contre, l'injection intracérébroventriculaire de peptides A β ou de lipopolysaccharide (LPS) chez ces animaux a été utilisée (Geula, Wu et al. 1998). L'injection intracérébrale de LPS (endotoxine et composant essentiel de la paroi des bactéries Gram négatif) conduit ainsi à une neuroinflammation chronique entraînant une neurodégénérescence hippocampique et des déficits de mémoire spatiale (Haus-Wegrzyniak, Dobrzanski et al. 1998).

Des **souris** présentant une sénescence accélérée ont pu être sélectionnées à partir du fond génétique AKR/J. Par exemple, chez les souris SAMP8 (senescence-accelerated mouse), l'âge est corrélé à une augmentation de dépôts de peptides A β diffus et de Cdk5, et à des déficits cholinergiques ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Les phénotypes de ces modèles sont généralement également associés à un stress oxydatif et à des dysfonctionnements métaboliques (Takeda 2009).

Des souris présentant une trisomie segmentaire du chromosome 16 ont été utilisées au départ pour étudier précisément les mécanismes génétiques impliqués dans les différents phénotypes associés au syndrome de Down. En effet, chez la souris, les orthologues du chromosome 21 humain sont répartis sur trois chromosomes : le 10, le 16 et le 17, le 16 portant la majorité des gènes portés par le chromosome 21 humain. Les souris de la souche Ts65Dn sont les souris de ce type les plus utilisées. Elles présentent des déficits synaptiques et cognitifs ainsi qu'une dégénérescence des neurones cholinergiques qui dépend de la quantité d'APP elle-même dépendante du gène correspondant (Reeves, Irving et al. 1995).

C'est chez le **rat** que l'une des premières démonstrations de l'effet toxique du peptide A β sur les neurones a été réalisée (Frautschy, Baird et al. 1991). Dans cette étude, des noyaux de plaques amyloïdes ont été injectés dans le cortex et l'hippocampe. Des fractions de lipofuscine (pigment cellulaire composé de débris de molécules qui apparaît dans les cellules des personnes âgées) issues de cerveaux humains contrôles ont été injectées dans la partie controlatérale. Un mois après l'injection, les couches hippocampiques ont présenté une perte neuronale considérable. A chaque fois, ces effets ont été décrits à proximité de matériel immunoréactif dirigé contre le peptide A β . Après l'injection de lipofuscine, aucune perte neuronale marquée n'a été observée. Ces résultats sont parmi les premiers à avoir indiqué l'existence d'une réponse neuronale vis-à-vis de la composante amyloïde.

Chez le rat toujours, l'injection intraventriculaire de peptide A β_{40} uniquement conduit généralement à la formation de dépôts diffus de peptides A β avec très peu de dépôts similaires à des plaques amyloïdes 30 jours après l'injection. Cependant, de nombreux dépôts épars, similaires à des plaques amyloïdes, ont pu être produits chez des rattes reproductrices Sprague-Dawley (**Figure 14**) à la retraite par l'intermédiaire d'injections intraventriculaires de peptide A β combinées à l'injection neuropilaire de TGF- β (facteur de croissance transformant) (Frautschy, Yang et al. 1996). Ce type de modèle est très utile en complément des modèles transgéniques pour mieux comprendre la neuropathologie de la MA. Ce modèle a été tout particulièrement utile dans le développement et l'évaluation de thérapeutiques (Begum, Yang et al. 2008; Woodruff-Pak 2008).



Figure 14 : Rat Sprague-Dawley, rat de laboratoire.

http://www.allposters.fr/-sp/White-Laboratory-Rat-Sprague-Dawley-Variety-a-Common-Laboratory-Animal-Rattus-Affiches_i6010439_.htm

La séquence APP correspondant aux peptides A β est la même chez le **cochon d'Inde** et l'homme. Ainsi, il semble être un modèle plus physiologique que la souris notamment pour examiner les effets à long terme des manipulations expérimentales du métabolisme de l'APP et de la formation des plaques *in vivo*. De plus, le

métabolisme de l'APP dans des cultures cellulaires de cochons d'Inde est similaire à celui de cultures cellulaires d'origine humaine (Beck, Bigl et al. 2003).

Des autopsies de patients atteints de MA ont révélé un lien possible entre la maladie des artères coronaires, le cholestérol et la MA. Par ailleurs, d'un point de vue phylogénétique, les **lapins** sont plus proches de l'homme que les rongeurs (Graur, Duret et al. 1996). La proximité phylogénétique des lapins et des primates s'exprime notamment dans la séquence aminée du peptide A β qui est à 97 % égale à celle de la séquence humaine (Johnstone, Chaney et al. 1991). Ainsi, des lapins alimentés avec un régime enrichi en cholestérol ont été utilisés premièrement comme modèle animal de la maladie des artères coronaires puis de la MA aux vues des découvertes d'autopsie évoquées précédemment (Sparks 2008). Ces lapins présentent notamment un conditionnement palpébral altéré ainsi que des dépôts diffus de peptides A β , une hyperphosphorylation de Tau, une inflammation vasculaire et une perte neuronale. Le conditionnement palpébral repose sur l'association d'un stimulus élémentaire tel qu'un son ou une lumière avec la présentation d'un souffle d'air au niveau de l'œil. Cette association se traduit par la mise en place d'une réponse conditionnée qui consiste en un clignement de la paupière. Le lapin et l'homme présentent, avec l'âge, un conditionnement palpébral altéré de façon similaire. Chez l'homme, ce conditionnement affiche des troubles qui augmentent à partir de la quarantaine jusqu'à la soixantaine (Woodruff-Pak and Jaeger 1998). Cette forme d'apprentissage associatif est sévèrement atteinte chez les patients Alzheimer. Ces troubles sont propres à la MA, on ne les retrouve pas chez d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou d'Huntington (Woodruff-Pak and Papka 1996). Il a également été montré que la qualité de l'eau pouvait influencer la quantité de peptides A β retrouvée chez ce modèle. Les animaux abreuvés avec de l'eau du robinet ont davantage de peptides A β au niveau cérébral que ceux abreuvés avec de l'eau distillée (Sparks, Lochhead et al. 2002; Sparks, Friedland et al. 2006). Des traces de cuivre dans l'eau de boisson seraient responsables de l'élévation de la quantité de peptides A β chez les animaux abreuvés avec de l'eau du robinet. Ainsi, des apports en cholestérol dans l'alimentation entraînent l'accumulation de peptides A β tandis que la présence de cuivre dans l'eau de boisson altère leur élimination. De même, nourrir des lapins de façon chronique avec une nourriture enrichie en cholestérol conduit à une augmentation du contenu en cholestérol de leurs neurones (Ghribi 2008). Cette concentration intraneuronale élevée en cholestérol est accompagnée d'une augmentation des niveaux de BACE1 (Ghribi, Larsen et al. 2006). L'augmentation du contenu intraneuronale en cholestérol pourrait sous-tendre à l'augmentation des quantités de BACE1 et de peptides A β qui, en retour, déclenchent l'hyperphosphorylation de Tau.

Les **chiens** sont également étudiés en raison de la proximité de leur vieillissement cérébral avec celui de l'homme. Dans les années 50 puis dans les années 70 (Wisniewski, Johnson et al. 1970), des chercheurs ont décrit la présence de plaques chez des chiens âgés. Les caractéristiques de ces dépôts amyloïdes n'ont été précisées qu'en 1990 (Giaccone, Verga et al. 1990). De plus, il a été établi que la séquence aminée du peptide A β est entièrement conservée entre le chien et l'homme (Johnstone, Chaney et al. 1991).

Des Beagles âgés de plus de 10 ans peuvent montrer des troubles de l'attention, des désorientations spatiales et un rythme diurne perturbé. Les dysfonctionnements cognitifs observés chez ces chiens âgés sont

associés à des dépôts diffus de peptides A β , une dystrophie neuritique et de la gliose mais peu de plaques amyloïdes sont développées chez ces animaux et ils ne présentent pas de corps neurofibrillaires (Cotman and Head 2008). Ces chiens peuvent présenter au niveau cérébral une dilatation ventriculaire, une atrophie corticale et hippocampique, une angiopathie amyloïde associée à une dégénérescence des cellules musculaires lisses et des hémorragies. D'un point de vue thérapeutique, les antioxydants ainsi que l'enrichissement de l'environnement (expérience cognitive d'environ 25 min / j, environnement sensoriel enrichi avec des jouets et 20 min de marche / j) ont été testés chez ces animaux. Après deux semaines, le régime enrichi en antioxydants a montré son efficacité sur l'attention spatiale et sur des tâches cognitives plus complexes plus tardivement. L'enrichissement de l'environnement a également montré des effets sur la cognition. Les groupes recevant les deux traitements en même temps ont présenté de meilleurs résultats que ceux n'en recevant qu'un. Les chiens traités ont montré également une préservation de leurs neurones ainsi qu'un moins grand nombre de dépôts amyloïdes.

En se basant sur l'hypothèse cholinergique, des **primates non-humains** traités avec de la scopolamine, anticholinergique se liant aux récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, constituent des modèles développant une amnésie et des lésions excitotoxiques du prosencéphale basal induisant des déficits cognitifs. De nombreux traitements symptomatiques pour la MA ont été évalués avec succès chez ces modèles, mais leur pertinence étiologique est faible (Bartus 2000).

L'intérêt pour d'autres modèles **primates non-humains** s'est développé après l'essai de vaccination contre le peptide A β à l'aide du vaccin AN 1792 pour lequel des patients ont développé une méningo-encéphalite qui n'avait pas été prédite par les études sur des modèles transgéniques (Robinson, Bishop et al. 2004). Depuis, l'efficacité et la sécurité d'un vaccin contre le peptide A β a été testé chez le singe grivet (*Chlorocebus aethiops*) (Lemere, Beierschmitt et al. 2004) (**Figure 15**). Les autres singes pouvant servir de modèles sont les lémuriers (*Microcebus murinus*) (Bons, Rieger et al. 2006), le Pinché à crête blanche (*Saguinus oedipus*) (Lemere, Oh et al. 2008), le Macaque rhesus (*Macaca mulatta*) (Gandy, DeMattos et al. 2004) et les singes Saïmiris (Elfenbein, Rosen et al. 2007). Un chimpanzé commun (*Pan troglodytes*) a été récemment décrit comme présentant une neuropathologie similaire à la MA complète incluant les plaques neuritiques et les enchevêtrements neurofibrillaires (Rosen, Farberg et al. 2008).

Le Microcèbe mignon (*Microcebus murinus*) est un petit lémurien de Madagascar. Il possède une espérance de vie assez courte et les animaux de plus de 5 ans sont considérés comme âgés. La majorité de ces singes présente un vieillissement cérébral normal, seuls 20 % développent une neurodégénérescence. Chez le Microcèbe, la neurodégénérescence associée à l'âge est caractérisée par une atrophie cérébrale massive, la présence de nombreuses plaques amyloïdes, une pathologie Tau et une perte des neurones cholinergiques. Alors que les Microcèbes présentant un vieillissement cérébral normal conservent leurs capacités mnésiques ainsi que des interactions sociales, les animaux présentant une neurodégénérescence liée à l'âge perdent ces mêmes capacités cognitives et sociales qui sont similaires à celles observées chez les individus humains atteints de MA. Ainsi, ce petit lémurien apparaît comme étant un modèle intéressant pour l'étude du vieillissement cérébral normal et des dysfonctionnements biochimiques qui surviennent au cours de la neurodégénérescence

liée à l'âge. Il pourrait devenir un modèle de plus en plus important dans le développement de nouveaux traitements contre la MA (Bons, Rieger et al. 2006).



Figure 15 : Singes modèles animaux de la MA. A : Singe grivet ; B : Microcèbe ; C : Pinché à crête blanche ; D : Macaque rhésus ; E : Singe Saïmiris ; F : Chimpanzé commun.¹

1.2.2.3. Modèles transgéniques non mammifères

1.2.2.3.1. Etudes chez la drosophile

Les modèles invertébrés et en particulier celui de la mouche apparaissent comme un puissant outil pour l'étude de la neurodégénérescence. Une douzaine de lignées transgéniques peuvent être générées en même temps, ce qui n'est pas possible avec les modèles souris par exemple. L'utilisation de *Drosophila melanogaster* comme modèle animal de neurodégénérescence incluant la MA a débuté au 21^{ème} siècle (Driscoll and Gerstbrein 2003). La séquence génomique de *Drosophila melanogaster* a été cartographiée en 2000 et a confirmé une séquence remarquablement homologue à celles des Mammifères (Adams, Celniker et al. 2000) (**Figure 16**).

L'étude de la drosophile comme modèle de la MA présente différents avantages. En effet, la durée de vie de ces mouches est de 2 à 3 mois ce qui facilite l'étude des troubles se manifestant en fin de vie. De plus, leur élevage est très facile.

Par ailleurs, la drosophile a un cerveau bien organisé et permet d'étudier des comportements complexes tels que l'apprentissage et la mémoire. Le cerveau de cette mouche est constitué d'un moins grand nombre de cellules (environ 10⁵) que celui de l'homme (environ 10¹¹) et son organisation structurelle est différente, mais la biologie cellulaire de base et le système de neurotransmetteurs sont remarquablement conservés.

1

A : <http://www.flickr.com/photos/sebjen/3392530782/> ;

B : http://fr.wikipedia.org/wiki/Microc%C3%A8be_mignon ;

C : <http://news.softpedia.com/news/Leading-Wives-Can-Have-Two-Husbands-2.jpg/> ;

D : <http://www.flickr.com/photos/pauljill/2155232336/> ;

E : <http://www.laurent-even.com/2011/08/29/singe-saimiri/> ;

F : <http://www.biopix.eu/photo.aspx?photoid=17124&photo=pan-troglodytes>.

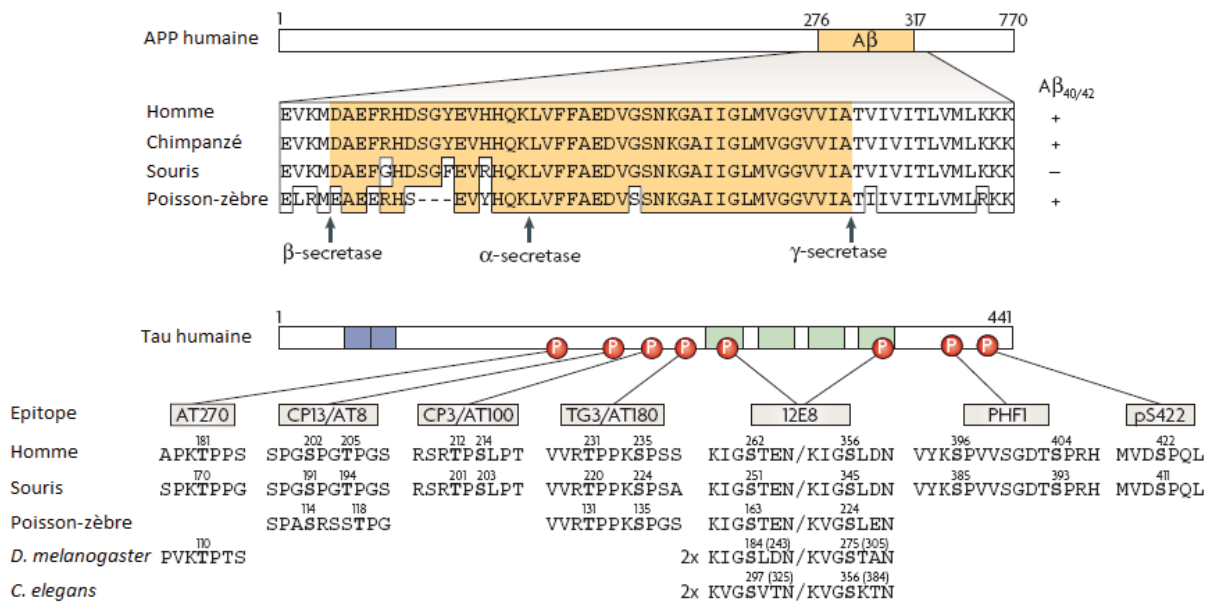


Figure 16 : Alignement des séquences de l'APP et de Tau d'espèces vertébrées et invertébrées.

En haut : Toutes les protéines APP hormis celle de la souris peuvent être clivées de façon protéolytique conduisant à la formation de peptides Aβ_{40/42}.

En bas : La plus longue isoforme de Tau, htau40, contient deux inserts amino-terminaux (en bleu) et quatre domaines de liaison aux microtubules (en vert). Des anticorps anti-Tau phospho-dépendants sont utilisés en routine (rectangles grisés). Les séquences de Tau sont très homologues chez la souris et l'homme, ce qui explique pourquoi la plupart des anticorps phospho-dépendants listés ici réagissent aussi bien avec la Tau humaine que la murine (Gotz and Ittner 2008).

Différentes méthodes utilisant des indices aussi bien olfactifs que visuels et gustatifs ont été développées pour étudier la mémoire de la mouche. Le conditionnement olfactif pavlovien classique est un test particulièrement sensible et fiable pour mesurer l'apprentissage et la mémoire associative d'une manière quantitative (Iijima and Iijima-Ando 2008). Le peptide Aβ ne peut pas être produit spontanément dans le cerveau de la drosophile en dépit de l'existence d'une protéine semblable à l'APP, étant dépourvue d'activité β-sécrétase. En surproduisant les peptides Aβ₄₀ et Aβ₄₂ humains, indépendamment, dans des cerveaux de mouches, ils vont tous deux s'accumuler au cours du vieillissement bien que seuls les peptides Aβ₄₂ vont clairement former des dépôts amyloïdes. Ces observations sont en corrélation avec ce que l'on retrouve chez l'homme atteint de MA. En parallèle de ces accumulations, les mouches Aβ₄₀ et Aβ₄₂ présentent des déficits de mémoire à court terme liés à l'âge, ce qui suggère qu'un excès d'Aβ₄₀ ou d'Aβ₄₂ est toxique pour la plasticité synaptique (Iijima and Iijima-Ando 2008).

D. melanogaster est un système adapté pour présélectionner *in vivo* de potentiels candidats thérapeutiques tels que des inhibiteurs de γ-sécrétase (Micchelli, Esler et al. 2003).

Le cerveau de drosophile ne permet pas l'étude de certaines capacités mnésiques liées à des structures cérébrales telles que l'hippocampe par exemple en comparaison à celui des Mammifères. Cependant, ces organismes invertébrés relativement simples vont permettre de relier des aspects génétiques de la MA au domaine de l'apprentissage et de la mémoire (Woodruff-Pak 2008). En effet, ces modèles permettent de réaliser des analyses génétiques détaillées.

La drosophile a été également utilisée pour développer des modèles de tauopathie. L'expression du transgène Tau humain sauvage ou muté conduit à l'expression d'un phénotype malade : atrophie des yeux à la naissance qui persiste au cours de la vie de l'animal et neurodégénérescence progressive au cours de la vie adulte qui conduit à une mort prématurée. Ces modèles présentent une phosphorylation anormale de Tau, des signaux de mort cellulaire par l'intermédiaire de l'activation de TOR (target of rapamycin), une inhibition de l'activation du cycle cellulaire, un stress oxydatif et des perturbations de la transmission synaptique. Ces différents aspects pathologiques peuvent constituer des cibles thérapeutiques qui pourront être évaluées de façon relativement simple dans ces modèles. Cependant, les modèles n'exprimant que Tau ne présentent jamais de corps neurofibrillaires (Khurana 2008).

1.2.2.3.2. Etudes chez le nématode

Caenorhabditis elegans présente également une durée de vie courte. De plus, certaines études sur l'interférence ARN par exemple sont plus faciles que chez la mouche. En effet, les vers peuvent se développer sur des gels d'agar contenant des bactéries génétiquement modifiées (Gotz and Ittner 2008).

L'expression de protéine Tau humaine sauvage et mutée chez *C. elegans* conduit à des anomalies comportementales et synaptiques. Chez les animaux exprimant la protéine Tau mutée, le phénotype est plus précoce et plus sévère (Kraemer, Zhang et al. 2003; Miyasaka, Ding et al. 2005). De plus, le rôle de l'ubiquitine ligase CHIP (carboxyl terminus of Hsc-70 interacting protein) dans la formation des filaments insolubles de Tau a été confirmé par l'intermédiaire de son inhibition à l'aide d'interférence ARN chez le nématode (Dickey, Yue et al. 2006). *C. elegans* a été également utilisé pour l'identification d'*aph-2* et *pen-2*, sous-unités du complexe γ -sécrétase (Francis, McGrath et al. 2002).

C. elegans possède trois gènes orthologues à la préséniline humaine : *sel-12*, *hop-1* et *spe-4* (Newman, Musgrave et al. 2007).

La ponte des œufs de *C. elegans* est contrôlée par un programme moteur simple impliquant un petit réseau de motoneurones et de cellules musculaires lisses qui est régulé par de nombreux stimuli sensitifs (Schafer 2006). La ponte peut être altérée par des mutations de l'homologue de *PSEN*, *sel-12*. Il a été montré qu'un facteur de transcription, une histone déacétylase et/ou une histone déméthylase, pourrait supprimer les problèmes de ponte et même restaurer le phénotype de ces mutants préséniline (Smialowska and Baumeister 2006).

1.2.2.3.3. Etudes chez le poisson-zèbre

Le poisson-zèbre ou *Danio rerio* est un modèle malléable et accessible qui possède une structure neurale et un génome de vertébré. Les nombreux embryons du poisson-zèbre sont fertilisés dans le milieu extérieur ce qui en fait un modèle simple d'utilisation en ce qui concerne les manipulations génétiques par injection d'oligonucléotides anti-sens, d'ARNm ou de transgènes. Ces embryons peuvent également se développer sur des milieux micro titrés permettant le criblage de certaines molécules thérapeutiques. Ce modèle est aussi couramment utilisé pour déterminer les caractéristiques (comportement, interaction) de certains types cellulaires.

Les gènes du poisson-zèbre orthologues à ceux impliqués dans la MA ont été définis, ils sont au nombre de douze : *appa* et *appb* (*APP*), *psen1* (*PSEN1*), *psen2* (*PSEN2*), *apoeb* (*APOE*), *mapta* et *maptb* (*MAPT*), *Clu* (*CLU*), *picalm* (*PICALM*), *ncstn* (*NCT*), *aph1b* (*APH1b*) et *psenen* (*PSENE1*) (Newman, Verdile et al. 2011). Très souvent, deux gènes du poisson-zèbre vont remplir la fonction d'un orthologue. Ceci s'explique par une duplication génomique qui serait survenue chez les téléostes.

Les embryons de poisson-zèbre peuvent notamment être utilisés pour analyser les différences d'activités de plusieurs mutants de l'APP (Joshi, Liang et al. 2009). L'expression du gène *appb* serait sous le contrôle d'un élément régulateur dans le premier intron du gène (Lee and Cole 2007; Shakes, Malcolm et al. 2008). L'étude de la toxicité des peptides A β semble plus délicate et aucune étude n'a été publiée à ce sujet pour le moment. Certaines équipes essaient de montrer la toxicité du peptide A β_{42} directement par l'intermédiaire de l'altération des rayures noires du poisson. Pour l'instant, ce phénotype pathologique visible survient trop tardivement pour réaliser un criblage de molécules thérapeutiques (Newman, Verdile et al. 2011). En ce qui concerne l'étude des présénilines, elles se sont concentrées sur *psen1*, les mutations de *PSEN1* étant le plus fréquemment impliquées dans les formes familiales de MA. *Psen1* chez le poisson-zèbre présente suffisamment de différences dans sa structure primaire avec celle de la protéine humaine pour que le clivage de l'APP par la γ -sécrétase soit anormal conduisant à une augmentation relative de la production de peptide A β_{42} par rapport à l'A β_{40} (Ratovitski, Slunt et al. 1997).

L'étude de ces gènes chez ce poisson a permis de mettre en évidence leurs caractéristiques uniques (épissage, début et localisation de l'expression, modifications post-traductionnelles...) qu'il aurait été plus difficile d'observer chez d'autres modèles (Newman, Verdile et al. 2011).

1.2.2.4. Modèles transgéniques mammifères

1.2.2.4.1. Etudes chez la souris

Au cours des deux dernières décennies, un certain nombre de souris transgéniques a été créé surexprimant l'APP et/ou une préséniline contenant une ou deux mutations retrouvées dans les formes familiales de MA. Ces souris présentent de nombreux aspects de la maladie incluant la neuropathologie amyloïde, l'angiopathie cérébrale amyloïde, la perte synaptique, des neurites dystrophiques et des cellules gliales réactives ainsi que des troubles de la plasticité synaptique, de l'apprentissage et de la mémoire. Ces modèles murins développent ces caractéristiques à différents degrés et sont très utilisés pour étudier les rôles de l'APP, des peptides A β et de la pathologie amyloïde dans la pathogenèse de la MA. Cependant, dans ces modèles, les corps neurofibrillaires caractéristiques de la MA notamment sont absents. Même si le nombre de corps neurofibrillaires est corrélé avec la sévérité clinique de la démence des patients atteints de MA, aucune mutation de Tau n'a été liée à la MA. Cependant, des mutations de Tau conduisant à la présence de corps neurofibrillaires ont été retrouvées chez des patients atteints de démence fronto-temporale liée au chromosome 17 avec syndrome parkinsonien (DFTP-17). Cette démence fait partie de la même classe que la MA (classe I). Afin de retranscrire les deux caractéristiques neuropathologiques de la MA, plusieurs laboratoires ont créé des souris transgéniques exprimant différentes combinaisons de mutants APP, préséniline et Tau (Chin 2011) (**Figure 17**).

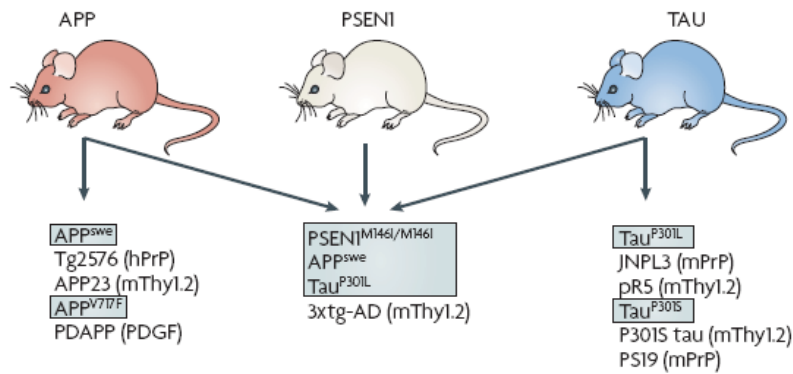


Figure 17 : Souris transgéniques reproduisant les plaques séniles et/ou les corps neurofibrillaires. Quelques exemples de mutations sont listés ici (cadres grisés) associés aux noms des souches de souris correspondantes et du promoteur (entre parenthèses) ayant servi à l'expression du transgène (Gotz and Ittner 2008).

De nombreux gènes ont été identifiés comme facteurs de risque de la MA. La fonction de bon nombre de ces gènes a une influence sur la transformation de l'APP, la fibrillisation du peptide A β , son dépôt, et/ou sa clairance ainsi que la phosphorylation de Tau (**Figure 18**).

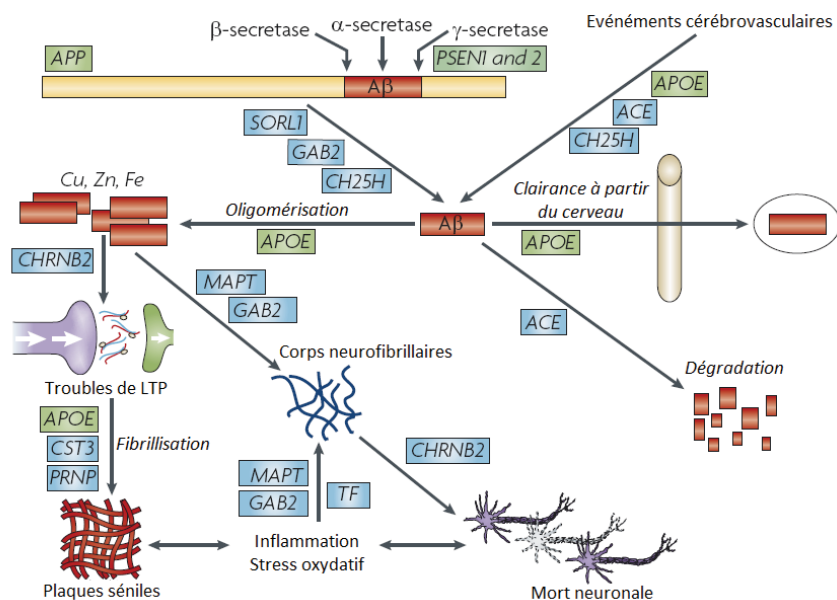


Figure 18 : Résumé des rôles pathogénétiques possibles de gènes candidats des formes familiales précoces de MA. SORL1 et CH25H ont été reportés comme étant impliqués dans la transformation de l'APP et la production d'A β , SORL1 en affectant le métabolisme de l'APP et CH25H à travers la production de 25-hydroxycholestérol. GAB2 (protéine de liaison associée à GRB2) se lie à GRB2 qui se lie quant à elle à l'APP et aux présénilines 1 et 2. APOE (apolipoprotéine E) et CH25H affectent le métabolisme du cholestérol et ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine I) la pression sanguine. Ces deux gènes pourraient moduler les effets des événements cérébrovasculaires sur la production d'A β . Le peptide A β une fois produit peut être exporté en dehors du cerveau par l'intermédiaire de l'APOE. Le peptide A β peut être dégradé de façon protéolytique (par exemple par ACEI). Lorsque que le peptide A β s'accumule, il peut s'agréger sous l'influence de l'APOE. L'agrégation en oligomères peut conduire à des troubles de LTP (long-term potentiation). En effet, le gène CHRN2 code pour la sous-unité β -2 du récepteur neuronal à l'acétylcholine qui peut être affectée par le peptide A β . Les oligomères d'A β peuvent s'agréger par la suite en fibrilles qui constitueront au final les plaques séniles. La fibrillisation est dépendante de l'APOE, de la cystatine 3 (CST3) et de la protéine prion (PRNP). Les plaques séniles et les agrégats de peptides A β peuvent induire une réponse inflammatoire et un stress oxydatif. La transferrine (TF)

régule le métabolisme du fer, un métal réactif impliqué dans la formation de radicaux libres et ainsi dans le stress oxydatif. Le stress oxydatif et le fer sont associés à la phosphorylation anormale de Tau et à son agrégation ainsi qu'à la formation de corps neurofibrillaires. Tau est codé par le gène MAPT. GAB2 a été décrit comme pouvant affecter la phosphorylation de Tau et la formation de corps neurofibrillaires. Les oligomères d'A β induiraient la formation des corps. Ceux-ci induisent la mort neuronale qui peut également résulter de l'inflammation et du stress oxydatif. En retour, l'inflammation et le stress oxydatif peut par la suite contribuer au dépôt de peptides A β , ce qui conduit à un cercle vicieux. CHRN2 pourrait avoir un rôle neuroprotecteur. CHRN2 influence également l'activité cholinergique et pourrait avoir des effets pathogéniques sur la cognition. En vert : les gènes établis de la MA ; En bleu : les gènes candidats de la MA (Bertram and Tanzi 2008).

Les souris knock-out, knock-in et transgéniques présentant une expression altérée de ces différents gènes ont été utiles pour étudier leurs rôles dans la pathogenèse de la MA, en particulier les animaux exprimant à la fois les protéines APP et Tau humaines mutées (**Figure 19**).

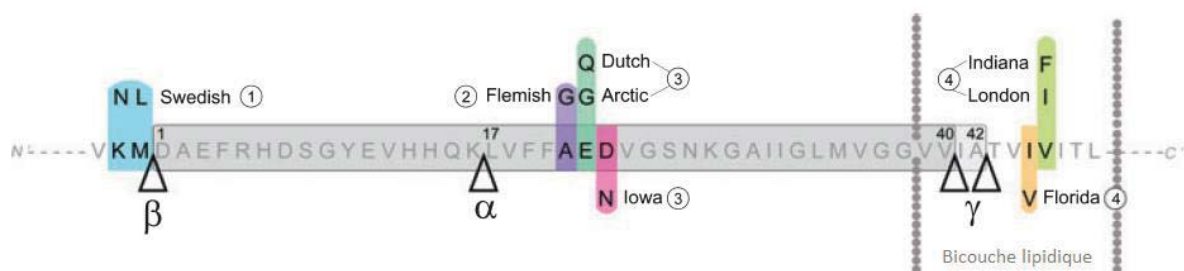


Figure 19 : Mutations de l'APP à l'origine de formes familiales de la MA utilisées chez les modèles transgéniques. La mutation suédoise (1) favorise le clivage de l'APP par la β -sécrétase tandis que la mutation flamande (2) défavorise en partie ce même clivage par l' α -sécrétase. Les mutations arctique, néerlandaise et de l'Iowa (3), localisées dans le domaine A β , augmentent principalement l'agrégation. Les mutations telles que la londonienne (4) altèrent le clivage et contribuent à l'augmentation de la quantité de peptides A β_{42} ou du ratio A β_{42} /A β_{40} (Philipson, Lord et al. 2010).

La MA est caractérisée par de nombreux aspects neuropathologiques. De plus, les altérations neuronales qui se manifestent chez chaque modèle de souris s'expriment à des degrés divers. Ainsi, le choix du modèle de souris à utiliser dépend de la question que l'on se pose pour l'étude que l'on souhaite réaliser, aucun modèle de souris ne permettant de récapituler entièrement la neuropathologie de la MA. Par ailleurs, il faut tenir compte de ce que l'on souhaite étudier chez le modèle : aspects cellulaires, biochimiques, comportement etc. En effet, certains modèles de souris sont plus aptes à être testés en comportement que d'autres. Ceci est lié au profil d'expression du transgène, à l'âge de début de la pathologie et au fond génétique de chaque modèle.

Souris transgéniques APP et APP/PS1

Dix-sept acides aminés diffèrent entre l'APP humaine et la murine dont trois résident dans la séquence A β (**Figure 16**). Le peptide A β murin ne s'accumule pas à des taux aussi élevés que l'humain et ne forme pas de dépôt même lorsqu'il est surexprimé (Jankowsky, Younkin et al. 2007). Les souris transgéniques qui surexpriment l'APP humaine sauvage présentent une augmentation faible en peptides A β et une légère pathologie amyloïde.

Cependant, les souris transgéniques surexprimant l'APP humaine avec au moins une mutation familiale présentent une augmentation forte et associée à l'âge de la quantité de peptides A β et une pathologie amyloïde similaire à celle observée chez l'homme (**Figure 20**).

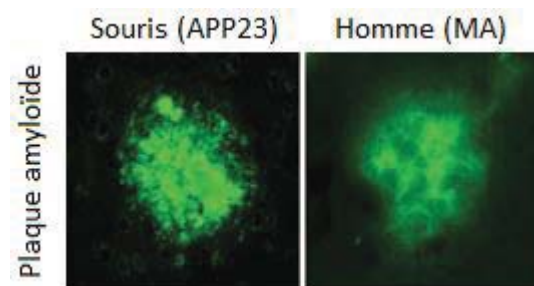


Figure 20 : Plaques amyloïdes représentatives d'une souris APP23 et d'un cerveau humain atteint de MA visualisées à l'aide d'une coloration à la thioflavine S (Gotz and Ittner 2008).

De plus, ces souris présentent également les pathologies amyloïdes vasculaire et parenchymateuse, des neurites dystrophiques associés aux plaques, une activation microgliale, des troubles synaptiques ainsi que des déficits de plasticité synaptique, d'apprentissage et de mémoire (Chin 2011).

Les mutations du gène codant pour l'APP des formes familiales autosomiques dominantes de la MA ont été nommées en fonction des régions géographiques où elles ont été identifiées (**Figure 19**). Voici les mutations de l'APP les plus utilisées pour la création de modèles murins (la numérotation correspond à l'isoforme la plus longue de l'APP, APP770) :

- La double mutation suédoise (K670N et M671L) qui rend l'APP plus favorable au clivage par BACE, ce qui augmente la production de peptides A β .
- La mutation londonienne (V717I) ou de l'Indiana (V717F) favorise la transformation de l'APP en peptide A β_{42} par l'action de la γ -sécrétase.
- La mutation arctique (E693G) affecte le 22^{ème} acide aminé du peptide A β , diminue l'activité de l' α -sécrétase (voie de transformation non-amyloïdogénique) et augmente ainsi la capacité d'agrégation du peptide A β .
- La mutation néerlandaise (E693Q) affecte également le 22^{ème} acide aminé du peptide A β mais augmente quant à elle la production de peptide A β_{40} et le ratio A β_{40} /A β_{42} .

Les promoteurs couramment utilisés pour l'expression du transgène sont : le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'antigène de surface cellulaire Thy-1 ou Thy-1.2. Ces promoteurs sont neurone-spécifiques. Le prion de hamster (PrP) est préférentiellement exprimé dans les neurones mais également dans de nombreuses cellules et types cellulaires.

Les principales souris transgéniques APP et APP/PS1 sont présentées dans le tableau ci-après (**Tableau 3**).

Souris transgénique	Transgène (mutation)	Promoteur	Souches	Plaques amyloïdes	Corps neurofibrillaires	Perte neuronale	Déficits mnésiques	Première référence
PDAPP	APP695, 751, 770 (APPInd)	PDGF-β	C57Bl/6 J, DBA/2, Swiss-Webster	6-9 mois	∅	∅	Oui	(Games, Adams et al. 1995)
Tg2576	APP695 (APPSwe)	PrP hamster	C57Bl/6SJL, C57Bl/6	9 mois	∅	∅	Oui	(Hsiao, Chapman et al. 1996)
APP23	APP751 (APPSwe)	Thy-1 souris	C57Bl/6, DBA/2	6 mois (AAC sévère également présente)	∅	14 mois	Oui	(Sturchler-Pierrat, Abramowski et al. 1997)
J20	APP695, 751, 770 (APPSwe, Ind)	PDGF-β	C57Bl/6	6 mois	∅	∅	Oui	(Mucke, Masliah et al. 2000)
TgCRND8	APP695 (APPSwe, Ind)	PrP hamster	C3H, C57Bl/6	3 mois	∅	∅	Oui	(Chishti, Yang et al. 2001)
mThy1-hAPP751	APP695 (APPSwe, Lon)	Thy-1 souris	C57Bl/6, DBA/2	3-4 mois	∅	∅	Oui	(Rockenstein, Mallory et al. 2001)
APPDutch	APP751 (APPDutch)	Thy-1 souris	C57Bl/6 J	22 mois (seulement AAC)	∅	Non reporté	Non reporté	(Herzig, Winkler et al. 2004)
ARC6, ARC48	APP695, 751, 770 (APPSwe, Ind, Arc)	PDGF-β	C57Bl/6	3 mois (6) 2 mois (48)	∅	∅	Non (6) Oui (48)	(Cheng, Palop et al. 2004)
PSAPP	Tg2576 X PSEN1-M146L	PrP hamster PDGF-β	C57Bl/6SJL, C57Bl/6, Swiss-Webster	6 mois	∅	∅	Oui	(Holcomb, Gordon et al. 1998)
5XFAD	APP695 (Swe, Lon, Flo) PSEN1-M146L, L286V	Thy-1 souris (X2)	C57Bl/6SJL	2 mois	∅	9 mois	Oui	(Oakley, Cole et al. 2006)

Tableau 3 : Souris transgéniques APP et APP/PS1 et leurs caractéristiques (Chin 2011).

Souris transgéniques Tau

Les mutations de l'APP et/ou des présénilines, chez l'homme, conduisent à une forme classique de MA avec la présence à la fois de plaques amyloïdes et de corps neurofibrillaires. A l'heure actuelle, on ne s'explique pas pourquoi les souris exprimant des mutants APP et/ou présénilines ne développent pas de corps neurofibrillaires.

Les souris transgéniques Tau ont été développées afin d'étudier le rôle de Tau dans la neurodégénérescence.

Voici les trois principaux modèles de souris transgéniques Tau utilisées mais il en existe de nombreux autres (**Tableau 4**) :

- **JNPL3** : La souris JNPL3 exprime le transgène *MAPT* 4R0N avec la mutation P301L sous le contrôle d'un promoteur de protéine prion de souris (Lewis, McGowan et al. 2000). Les souris hétérozygotes expriment le transgène Tau à un niveau approximativement équivalent à celui du gène Tau endogène, alors que les homozygotes l'expriment en quantité deux fois supérieure. Les souris hétérozygotes développent progressivement des anomalies motrices et de comportement associées à une pathologie neurofibrillaire et une perte neuronale dans la moelle spinale à partir de 6,5 mois d'âge. A 10 mois, 90 % des souris présentent de sévères troubles moteurs. Des pré-corps sont observés dans l'ensemble du cerveau et des corps neurofibrillaires sont présents dans la moelle spinale, le tronc cérébral et le cervelet. La présence des corps extracellulaires est cohérente avec la perte de 50 % de neurones moteurs dans la moelle spinale. C'est le premier modèle de souris transgénique qui a démontré que Tau seule peut causer des dommages cérébraux et de la perte cellulaire.
- **rTg4510** : Ces souris sont des souris transgéniques Tau inductibles qui expriment la protéine Tau avec la mutation P301L (Santacruz, Lewis et al. 2005). L'expression du transgène peut être supprimée par la doxycycline (système TET-off (tétracycline) : le transgène Tau s'exprime quand la souris est nourrie de façon ordinaire alors qu'il est inhibé lorsqu'elle est nourrie avec une alimentation comprenant de la doxycycline. Ces souris expriment la protéine Tau mutée en quantité 13 fois supérieure à l'endogène. Elles présentent des pré-corps dès 2,5 mois d'âge et des inclusions similaires à des corps neurofibrillaires entre 4 et 5 mois. La perte neuronale coïncide également avec la formation des corps, ce qui conduit à une perte de poids cérébrale globale à 5,5 mois d'âge comprenant 60 % de perte neuronale dans la région CA1. A 10 mois, le prosencéphale est très atrophié. Des déficits mnésiques sont observés chez des souris très jeunes de 1,5 à 2,5 mois et progressent avec l'âge. La suppression de l'expression de la protéine Tau mutée conduit à l'amélioration des performances cognitives et réduit la perte neuronale même si la pathologie Tau continue de progresser. Ces résultats suggèrent qu'il existe une dissociation entre la perte de mémoire et la progression des corps neurofibrillaires ainsi qu'une dissociation entre ces derniers et la perte neuronale.

- **Htau** : Ces souris expriment la protéine Tau humaine sur un fond génétique KO pour la protéine Tau (Andorfer, Kress et al. 2003). Le transgène dérivait à l'origine du chromosome artificiel humain dérivé du phage P1 sous le contrôle du promoteur humain de Tau à partir duquel les six isoformes humaines de Tau sont produites (Duff, Knight et al. 2000). A 6 mois d'âge, ces souris ont une hyperphosphorylation de Tau dans les corps cellulaires neuronaux. A 15 mois, elles présentent des corps neurofibrillaires et une perte neuronale. Dans les régions corticales et hippocampiques, on retrouve à la fois la protéine Tau hyperphosphorylée et des corps neurofibrillaires et pas ou peu dans le striatum, le cervelet ou la moelle spinale à l'image de ce que l'on a chez l'homme atteint de MA. Ces souris ne présentent pas de troubles locomoteurs. Par ailleurs, les souris exprimant la protéine Tau humaine et la protéine Tau murine ne développent pas de corps neurofibrillaires, alors que ces souris Htau le font, ce qui suggère que la Tau murine interfère avec la capacité de la Tau humaine à développer la pathologie.

Gène	Mutation/construction	Promoteur	Pathologie Tau	Références
<i>Mapt</i>	Isoforme 4R/2N	Thy1	Filaments enchevêtrés de protéine Tau hyperphosphorylée	(Gotz, Probst et al. 1995)
			Axonopathie sans formation d'enchevêtrement	(Spittaels, Van den Haute et al. 1999)
	Isoforme 3R/0N (Tau fœtale)	Protéine Prion	Corps neurofibrillaires intra cérébraux à 18 mois	(Ishihara, Hong et al. 1999)
	P301L	Protéine Prion	Pathologie neurofibrillaire à 2,5 mois	(Santacruz, Lewis et al. 2005)
	P301L	Thy1.2	Pathologie neurofibrillaire à 3 mois	(Gotz, Chen et al. 2001)
	Surexpression de P301L inducible	Protéine kinase II Ca ²⁺ calmoduline dépendante	Pathologie neurofibrillaire à 2,5 mois	(Takashima, Murayama et al. 1998)
	Tau génomique	Endogène	Enflures axonales Tau-immunoréactives	(Duff, Knight et al. 2000)
	G272V	Protéine Prion	Lésions fibrillaires oligodendrogiales	(Gotz, Tolnay et al. 2001)
	P301S	Thy1.2	Pathologie Tau à 5 mois	(Allen, Ingram et al. 2002)
	G272V, P301L, R406W	Thy1	Pathologie Tau à 1,5 mois Aucun trouble moteur jusqu'à 12 mois d'âge	(Lim, Hernandez et al. 2001)
	V337M	PDGF-β	Neurodégénérescence et accumulation de protéine Tau phosphorylée	(Tanemura, Murayama et al. 2002)
	R406W	Protéine kinase Ca ²⁺ calmoduline dépendante	Inclusions de protéine Tau hyperphosphorylée dans le prosencéphale à 18 mois Aucun trouble moteur jusqu'à 23 mois d'âge	(Tatebayashi, Miyasaka et al. 2002)
	G272V et P301S	Thy1.2	Tau hyperphosphorylée, corps neurofibrillaires et enchevêtrements Aucun trouble moteur jusqu'à 18 mois d'âge	(Schindowski, Bretteville et al. 2006)
	P301S	Protéine Prion	Tauopathie avec dégénérescence, perte synaptique et activation microgliale	(Yoshiyama, Higuchi et al. 2007)
<i>ApoE</i>	ApoE4	Multiple	Tau phosphorylée dans le cortex, l'hippocampe et l'amygdale	(Tesseur, Van Dorpe et al. 2000)
<i>Cdk5r1</i>	P25	Enolase neurone-spécifique	Tau phosphorylée dans le cortex, l'hippocampe et le thalamus	(Ahlijanian, Barrezaeta et al. 2000)
<i>VKαD11HuCk et VKαD11HuCy</i>	Anti-NGF IgH/Igk	Cytomégalovirus	Tau phosphorylée dans le cortex et l'hippocampe avec perte neuronale	(Capsoni, Ugolini et al. 2000)
<i>App, Psen1, Mapt</i>	PS1 (M146V), APP (Swe) et Tau (P301L)	Thy1.2	Pathologies Tau et amyloïde	(Oddo, Caccamo et al. 2003; Oddo, Caccamo et al. 2003)

Tableau 4 : Modèles de souris transgéniques de tauopathie communément utilisés (Ballatore, Lee et al. 2007). *VKαD11HuCk et VKαD11HuCy* portent les gènes des chaînes légères et lourdes des anticorps chimériques αD11 respectivement. Ig : immunoglobuline ; NGF : facteur de croissance des nerfs ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; PS1 : préséniline 1.

Souris transgéniques APP et Tau

Des croisements ont été effectués entre des souris transgéniques APP et Tau afin de mettre en évidence les interactions synergiques et pathogéniques qui existent entre A β et Tau.

Les souris **TAPP** sont issues du croisement de souris transgéniques Tg2576 (APP) et JNPL3, aboutissant à la création de souris doubles transgéniques qui présentent à la fois la pathologie amyloïde et la pathologie neurofibrillaire (Lewis, Dickson et al. 2001). La pathologie amyloïde et la production de peptides A β sont similaires à celles de la souris simple transgénique Tg2576. En effet, peu de plaques sont observables à 6 mois alors qu'elles sont nombreuses à 9. De même que chez la souris JNPL3 simple transgénique, quelques corps sont présents dans la moelle spinale et le tronc cérébral à 3 mois tandis qu'ils sont systématiquement présents entre 9 et 10 mois. Cependant, la pathologie neurofibrillaire est davantage prononcée dans le prosencéphale.

La souris **3XTG** est un modèle triple transgénique qui a été créé à l'aide de micro-injection d'APP_{Swe} et de Tau_{P301L} chez des embryons au stade une cellule de souris knock-in PSEN_{M146V} (Oddo, Caccamo et al. 2003). Les deux transgènes sont cointégrés et coségrégés à un seul locus, ce qui crée une souris triple transgénique qui est élevée comme une souris simple transgénique. L'expression des transgènes APP et Tau est sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Vers 3-4 mois d'âge, on retrouve des peptides A β intra neuronaux dans le cortex et dans l'hippocampe (CA1) à 6 mois. Aux alentours de 6 mois d'âge, des dépôts extracellulaires de peptides A β sont retrouvés dans le cortex frontal. Ces dépôts vont se propager à d'autres régions corticales et à l'hippocampe avec l'âge. Bien que les deux transgènes APP et Tau soient surexprimés à des niveaux similaires chez cette souris, la pathologie Tau n'est pas évidente avant 12 mois. Elle est alors observable dans l'hippocampe puis va s'étendre aux régions corticales avec l'âge. Par ailleurs, il semble y avoir peu de perte neuronale chez ces souris. Les déficits synaptiques et les troubles de LTP surviennent avant les plaques et la pathologie Tau. Les déficits cognitifs sont également observés avant le début des plaques et de la pathologie Tau et sont corrélés à la progression intra neuronale de l'accumulation de peptides A β (Billings, Oddo et al. 2005).

Les principales souris transgéniques Tau et APP/Tau sont présentées dans le tableau ci-après (**Tableau 5**).

Les souris transgéniques Tau ne présentent pas de pathologie A β ni de pathologie amyloïde, ce qui suggère que la pathologie amyloïde n'est pas sous le contrôle de la pathologie Tau. De plus, alors que les souris transgéniques APP avec des taux élevés de peptides A β présentent une hyperphosphorylation variable de Tau, la vraie pathologie Tau ne se développe pas. La création de souris double ou triple transgéniques exprimant à la fois APP et Tau a permis de mettre en évidence les interactions pathogéniques synergiques qui existent entre A β et Tau et suggère que les dysfonctionnements liés à Tau seraient induits par la pathologie A β . Cependant, il est également possible que les dysfonctionnements du peptide A β et de Tau apparaissent postérieurement à un facteur commun et qu'ils se développent différemment dans le temps (Small and Duff 2008).

Souris transgénique	Transgène (mutation)	Promoteur	Souches	Plaques amyloïdes	Corps neurofibrillaire	Perte neuronale	Déficits mnésiques	Première référence
JNPL3	MAPT 4RON (Tau-P301L)	PrP souris	C57Bl6 J, DBA/2, Swiss-Webster	∅	9 mois	6,5 mois	∅	1
rTg4510	MAPT 4RON (Tau-P301L)	PrP souris	129 S6, FVB/N	∅	4 mois (pré-corps à 2,5 mois)	5,5 mois	Oui	2
Htau	PAC humain, haplotype H1	Tau humaine	Swiss-Webster, 129, SVJ, C57Bl/6	∅	15 mois (pré-corps à 9 mois)	> 15 mois	Non reporté	3
TAPP	Tg2576 X JNPL3	PrP hamster PrP souris	C57Bl/6SJL, C57Bl/6, DBA/2, Swiss-Webster	9 mois	9 mois	6,5 mois	Oui	4
3XTG	APP695 (Swe) MAPT 4RON (P301L) PSEN1-M146V (KI)	Thy-1.2 souris (X2)	129, C57Bl/6	6 mois	12 mois	∅	Oui	5

Tableau 5 : Souris transgéniques Tau et APP/Tau et leurs caractéristiques (Chin 2011). Références : (1) (Lewis, McGowan et al. 2000) ; (2) (Santacruz, Lewis et al. 2005) ; (3) (Andorfer, Kress et al. 2003) ; (4) (Lewis, Dickson et al. 2001) ; (5) (Oddo, Caccamo et al. 2003).

1.2.2.4.2. Etudes chez le rat

Alors que de nombreuses souris transgéniques présentant la composante amyloïde de la maladie d'Alzheimer ont été développées, il existe très peu de modèles transgéniques rats présentant cette même composante. Certaines équipes de recherche ont développé des modèles transgéniques rats afin d'obtenir de meilleurs modèles pour l'utilisation de tests mnésiques et neurologiques notamment.

Il existe notamment trois lignées de rats modèles de la MA :

- la lignée UKUR25 exprimant les transgènes mutés humains APP751 et PS1,
- la lignée UKUR28 exprimant seulement le transgène muté humain APP751 et,
- la lignée UKUR19 exprimant seulement le transgène PS1.

Chez ces rats, l'expression des deux transgènes est limitée à l'hippocampe et au cortex. Les rats UKUR19 ne produisent pas de changement visible d'immunoréactivité au peptide A β . Les deux autres lignées de rats exprimant le transgène APP, UKUR25 et UKUR28, présentent une accumulation intraneuronale de peptides A β sans qu'il y ait formation de plaques ni augmentation d'immunoréactivité à l'APP. Ce phénotype apparaît dès 6 mois d'âge. Aucune plaque sénile n'est observée chez ces rats jusqu'à 24 mois. Par ailleurs, la lignée UKUR28 présente une augmentation de l'expression d'ERK2 sans qu'il y ait de changement de l'activité de la GSK-3 β (Echeverria, Ducatenzeiler et al. 2004).

Il existe également un modèle rat exprimant l'APP humaine présentant la mutation suédoise. Chez ce modèle, l'APP humaine est principalement exprimée dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. A partir de 15 mois d'âge, ces rats présentent une hyperphosphorylation de Tau et des peptides A β extracellulaires dont la quantité va augmenter avec l'âge. Le peptide A β est principalement retrouvé dans les vaisseaux sanguins cérébrovasculaires et quelques rares plaques diffuses sont également retrouvées dans le cerveau (Folkesson, Malkiewicz et al. 2007).

Il existe également une lignée de rat transgénique qui surexprime deux transgènes présentant des mutations familiales de la MA (deux pour l'APP et une pour la PS1). A partir de 9 mois, ces rats développent des dépôts amyloïdes aussi bien diffus que compacts. Ces derniers sont étroitement associés à de la microglie activée et à des astrocytes réactifs. Des troubles de LTP ont été également mis en évidence grâce à des enregistrements électrophysiologiques réalisés sur des coupes d'hippocampe de rats âgés de 7 mois, soit deux mois avant l'apparition des plaques. Ce déficit de LTP est accompagné de troubles de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris. Ces troubles deviennent plus prononcés à 13 mois d'âge. Aussi bien à 7 mois qu'à 13, les déficits mnésiques de ces rats transgéniques sont à corrélés avec la quantité totale d'A β ₄₂ dans l'hippocampe (Liu, Orozco et al. 2008).

Un autre modèle rat présente également des dépôts amyloïdes extracellulaires. Deux lignées de rats Sprague-Dawley exprimant des transgènes APP portant des mutations familiales de la MA (K670N/M671L et K670N/M671L/V717I) ont été croisées. Chez les rats doubles homozygotes, la production de peptides A β est suffisante pour permettre un dépôt vers 17-18 mois. Cet âge est réduit lorsque ces rats sont croisés avec une troisième lignée portant le transgène humain PS1 avec la mutation familiale M146V. Chez la lignée triple homozygote, les dépôts commencent à 7 mois d'âge. Les dépôts semblent similaires à ceux observés chez les modèles souris. Ces rats présentent également une réactivité gliale et la protéine Tau est hyperphosphorylée à proximité des dépôts. La quantité de peptides A β , mesurée par ELISA, est comparable à celle reportée chez les modèles souris, ce qui suggère qu'il n'est pas nécessaire d'avoir de grande quantité de peptides A β solubles, chez le rat, pour que se forment des dépôts (Flood, Lin et al. 2009).

1.2.2.5. Critères d'évaluation des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer

Ainsi, de nombreux modèles animaux très divers de la MA ont été créés. Chaque modèle animal présente des qualités qui lui sont propres mais aucun ne reproduit tous les aspects du vieillissement normal humain ni l'ensemble des caractéristiques neuropathologiques de la MA. Le développement de nouveaux modèles plus complets et l'étude de plusieurs modèles déjà existants permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la MA mais aussi d'optimiser des thérapies (Woodruff-Pak 2008).

Aucune espèce non humaine présentant une expression neuropathologique, cognitive et comportementale identique à celle décrite chez les formes familiales et sporadiques de MA n'a été décrite à ce jour. Le Microcèbe mignon développe de nombreuses caractéristiques de la MA humaine et certaines caractéristiques apparaissent également chez des espèces telles que le chien et les primates non-humains. Des manipulations génétiques et environnementales (développées ci-dessus) ont été utilisées chez d'autres espèces pour recréer les caractéristiques de la MA chez d'autres espèces. **La validité d'un modèle de la MA correspond à son degré de similitude avec la MA développée chez l'homme.** Un modèle « parfait » mimerait l'étiologie, la symptomatologie, les bases physiologiques retrouvées chez l'homme et un traitement effectif. On va pouvoir comparer différents aspects pour déterminer cela : l'aspect génétique, moléculaire, neurochimique, neurophysiologique, neuroanatomique, comportemental et l'aspect apprentissage, mémoire et cognition.

1.2.2.5.1. Validité génétique

D'un point de vue génétique, certains animaux modèles de la MA présentent des caractéristiques neuropathologiques de la maladie. La séquence aminée du peptide A β est presque entièrement conservée entre le chien et l'homme et les chiens âgés développent des dépôts amyloïdes intracérébraux. La séquence aminée de l'APP correspondant au peptide A β du Macaque cynomolgus est entièrement identique à celle de l'homme. Ce singe et peut-être d'autres primates constituent des modèles animaux proches de l'homme pour l'étude des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels de l'APP qui précèdent les dépôts amyloïdes (Podlisny, Tolan et al. 1991). Les lapins ont une espérance de vie de seulement 8 ans qui ne leur permet pas de développer naturellement des dépôts amyloïdes intracérébraux (Woodruff-Pak and Trojanowski 1996) alors que la séquence aminée du peptide A β est conservée à 97 % entre le lapin et l'homme. Les rongeurs ne développent jamais de dépôts amyloïdes naturellement et leur séquence aminée du peptide A β n'est pas similaire à celle de l'homme. Les souris développées pour présenter une sénescence accélérée présentent de nombreuses caractéristiques des stades précoces de la pathogenèse de la MA telles qu'une augmentation du stress oxydatif, des modifications amyloïdes, une phosphorylation anormale de Tau, une déplétion en acétylcholine et des troubles mnésiques et de l'apprentissage (Pallas, Camins et al. 2008). Les autres modèles rongeurs de la MA nécessitent l'injection intracérébrale de peptide A β chez les animaux adultes, chez le rat par exemple (Begum, Yang et al. 2008), ou l'insertion des gènes humains mutés APP (Wilcock and Colton 2008) ou Tau (Morgan, Munireddy et al. 2008) pour créer des modèles transgéniques souris présentant les caractéristiques neuropathologiques de la maladie. Des modèles de souris plus récents regroupent des caractéristiques génétiques conduisant à l'expression des deux composantes neuropathologiques majeurs de la MA à savoir la composante amyloïde et la composante Tau (Colton, Wilcock et al. 2008; Foy, Baudry et al. 2008). Alors qu'au cours de l'évolution la drosophile et les Mammifères ont divergé il y a plusieurs centaines de millions d'années, ils conservent encore génétiquement un programme de développement conservé de façon surprenante (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980).

1.2.2.5.2. Validité moléculaire

Les structures moléculaires de la neuropathologie de la MA sont conservées chez certaines espèces à espérance de vie longue et induites ou insérées chez les espèces à espérance de vie courte. Les cascades moléculaires qui conduisent à la MA ne sont pas entièrement comprises, bien que des progrès aient été faits dans leur élucidation. C'est vraiment grâce aux animaux modèles que les mécanismes moléculaires ont pu être imités et compris. Par exemple, les souris transgéniques ont permis de décrire la base génétique moléculaire de la maladie : production de peptides A β , puis développement de dépôts amyloïdes, puis phosphorylation anormale de Tau et enfin perte neuronale (Colton, Wilcock et al. 2008). Les mécanismes complexes de la toxicité du peptide A β ont également été étudiés chez la drosophile (Iijima and Iijima-Ando 2008).

1.2.2.5.3. Validité neurochimique

Les premiers progrès réalisés en thérapeutique se sont basés sur l'évidence neurochimique selon laquelle la MA est associée avec une déplétion sévère en un neurotransmetteur, l'acétylcholine. Un des critères

pour les animaux modèles de la MA est la simulation de cette perte ainsi que d'autres neurotransmetteurs. Dans ce cadre, les modèles primates non humains sont sensibles aux cholinergiques (Buccafusco 2008). Chez le lapin nourri avec un régime enrichi en cholestérol il existe une déplétion en acétylcholine (Sparks 2008). Une des principales limites des premiers modèles de souris de la MA était leur manque de validité neurochimique. Alors qu'ils présentaient de larges dépôts amyloïdes, leur système cholinergique n'était pas atteint. Les systèmes de neurotransmission chez la drosophile sont considérablement conservés en comparaison avec l'homme (Iijima and Iijima-Ando 2008). Cependant, les effets neuropathologiques sur les neurotransmetteurs de la drosophile n'ont pas encore été explorés.

1.2.2.5.4. Validité neurophysiologique

La proximité de la physiologie des primates non humains et de l'homme est un des grands avantages des modèles primates. La physiologie cérébrale de nombreux Mammifères allant des rongeurs aux primates non humains a de grande similitude, faisant des Mammifères des modèles animaux de la MA valides de ce point de vue. Certains aspects de biologie cellulaire et des systèmes de neurotransmission sont conservés chez la drosophile, mais la neurophysiologie des invertébrés est clairement plus éloignée de la neurophysiologie humaine que celle des Mammifères. Certaines équipes ont pu décrire la neurophysiologie des Mammifères en considérant sa relation avec l'apprentissage et la mémoire en étudiant notamment les propriétés électrophysiologiques du cerveau. La transmission et la plasticité synaptique sont sous le contrôle et reliées aux œstrogènes (Foy, Baudry et al. 2008).

1.2.2.5.5. Validité neuroanatomique

Un point important à prendre en compte est la complexité du cerveau de la drosophile (Iijima and Iijima-Ando 2008). Le cerveau de la mouche peut être évalué par de nombreux tests comportementaux. Pourtant, le cerveau de la drosophile a un nombre de cellules beaucoup plus faible que celui de l'homme et son organisation structurale diffère de celle des Mammifères. En effet, plus un Mammifère est proche d'un point de vue phylogénétique de l'homme, plus sa neuroanatomie est semblable à celle de l'homme. Le tronc cérébral chez les Mammifères est très conservé alors que le cortex cérébral est de plus en plus différencié des rongeurs, aux lagomorphes, en passant par les canidés et enfin les primates non humains. La MA a été initialement caractérisée comme étant une démence corticale, les structures du système limbique et du cortex cérébral étant parmi les premières à être affectées. Les primates non humains ont une validité plus importante de ce point de vue puisqu'ils peuvent être soumis à des tests évaluant les fonctions corticales supérieures. Cependant, certaines capacités cognitives atteintes dans la MA telles que le langage n'ont pas de modèle animal.

1.2.2.5.6. Validité comportementale

Utiliser le terme clinique « comportemental » fait référence aux aspects émotionnels de la maladie. En effet, certains patients atteints de MA manifestent des symptômes comportementaux et psychiatriques. Par exemple, certaines personnes deviennent irritables, anxieuses ou dépressives dans les premiers stades de la

maladie. Dans les stades tardifs, des troubles du sommeil et de l'agitation peuvent apparaître. Certains patients ont des accès physiques ou verbaux, une souffrance émotionnelle générale, sont agités et/ou font les cent pas. Quelques patients présentent quant à eux des délires de persécution, croyant par exemple que les membres de leur famille conspirent contre eux. Occasionnellement, les patients peuvent développer des hallucinations visuelles ou auditives. La plupart des modèles animaux de la MA n'ont pas ces caractéristiques comportementales de la maladie, leur validité comportementale est donc faible. De plus, les animaux n'étant pas doués de parole, la capacité à évaluer cet aspect est limitée. Certains effets secondaires des médicaments permettant d'améliorer la cognition testés chez les primates non humains sont proches des symptômes comportementaux (Buccafusco 2008). Ainsi, seuls les primates non humains pourraient faire l'objet de modèles valides d'un point de vue comportemental. Ceci est tout particulièrement vrai chez le Microcèbe mignon qui présente, dans certains cas, en fin de vie, des interactions sociales diminuées avec un comportement stéréotypé et des capacités cognitives réduites (Woodruff-Pak 2008).

1.2.2.5.7. Apprentissage, mémoire et cognition

La MA est caractérisée chez l'homme par un déclin progressif des capacités mnésiques et cognitives. La plupart des animaux modèles de la maladie présentent en partie cette dimension. La drosophile peut être testée en apprentissage et sur ses capacités mnésiques, de même que les souris, les rats, les lapins, les chiens et les singes. Les différentes tâches telles que l'apprentissage, la mémoire et la cognition sont testables chez les animaux modèles à des degrés divers et de façon plus ou moins proche de ce qui peut être évalué chez l'homme en fonction de l'espèce. Le conditionnement olfactif peut être évalué chez la drosophile et est altéré chez les patients atteints de la MA ainsi, pour cette tâche, le modèle semble valable. Cependant, chez l'homme atteint de MA, ce conditionnement est probablement affecté par la perturbation cholinergique hippocampique. Donc, les systèmes cérébraux responsables de l'altération du conditionnement olfactif chez la mouche et l'homme sont différents. Le conditionnement palpébral est affecté chez les patients atteints de MA et chez des lapins modèles de la MA nourris avec un régime enrichi en cholestérol, ceci permet d'évaluer de façon valable l'apprentissage et la mémoire chez ce modèle. De plus, les structures cérébrales dans lesquelles le régime a permis d'induire une neuropathologie de type MA et une perte neuronale sont les mêmes que celles affectées chez les patients atteints de MA (Sparks, Scheff et al. 1994; Sparks and Schreurs 2003; Woodruff-Pak, Agelan et al. 2007). Les souris transgéniques modèles de la MA sont très souvent testées avec des tâches spatiales qui ne sont pas directement parallèles aux tâches qui peuvent être utilisées pour tester l'homme. Cependant, aussi bien chez l'homme que chez la souris, ces tâches sont hippocampe dépendantes. Chez l'homme, l'hippocampe est affecté relativement précocement au cours de la progression de la maladie et les patients atteints présentent des capacités spatiales altérées ce qui assure la validité de ce type de tâches chez les rongeurs. Les tâches d'apprentissage spatial utilisées chez les rongeurs modèles de la MA sont soumises à une méthodologie précise (Morgan, Munireddy et al. 2008; Searce-Levie 2011). De nombreuses tâches peuvent être utilisées pour évaluer les canidés ; les capacités d'apprentissage, mnésiques et cognitives analogues à celles de l'homme peuvent être testées. Ces mêmes capacités chez les singes sont souvent plus proches de celles de l'homme (Buccafusco 2008).

1.2.2.5.8. Fiabilité du modèle

La fiabilité d'un modèle réside dans sa cohérence vis-à-vis de la maladie et sa reproductibilité. A savoir : est-ce qu'un laboratoire donné peut reproduire le modèle de façon identique ? Est-ce que d'autres laboratoires peuvent le reproduire ? Est-ce que la production du modèle est efficace en termes de coût et de temps ?

L'efficacité en termes de coût des animaux modèles de la MA varie en fonction de la taille et de la durée de vie des espèces impliquées. La drosophile, avec son espérance de vie extrêmement courte et sa prolificité élevée, est le modèle le moins coûteux. Ce modèle ne nécessite pas la formation d'animaliers et le coût de sa nourriture est minime. Les rongeurs sont les modèles Mammifères les moins coûteux, mais leur élevage est bien plus coûteux que celui des drosophiles. Le coût de l'achat, de l'élevage et des soins apportés aux lapins, aux chiens et aux singes augmente de façon exponentielle pour chaque espèce.

L'efficacité en termes de temps dépend de l'espérance de vie du modèle concerné. Encore une fois, la drosophile, avec sa durée de vie de 2 à 3 mois, permet un gain de temps bien plus important que la souris qui peut vivre jusqu'à 3 ans. D'un autre côté, les neuropathologies qui surviennent chez l'individu âgé ne se développent pas naturellement chez les espèces à espérance de vie courte. Même si la drosophile et la souris permettent de gagner du temps, il est donc nécessaire de compléter ces recherches par des études du développement naturel de la pathologie amyloïde chez des espèces présentant une plus longue espérance de vie telles que le chien et le singe.

1.2.2.5.9. Thérapeutique

Depuis des années, le but premier de la recherche sur la MA est d'éradiquer la maladie chez l'homme. L'objectif est de prévenir ou de guérir la maladie. Cependant, à l'heure actuelle, les chercheurs travaillent de façon à améliorer les thérapies palliatives et ont besoin de modèles animaux pour trouver des moyens d'améliorer la qualité de vie et la cognition des patients atteints de la maladie mais aussi pour trouver des traitements préventifs ou curatifs. La recherche préclinique sur les animaux modèles contribue au développement de tous les traitements potentiels contre la MA.

Les médicaments actuellement utilisés pour traiter les troubles cognitifs dans la MA ont été développés auparavant chez des modèles tels que les rongeurs, les lapins, les chiens et les primates non humains. Le travail sur les primates non humains est très important pour assurer la sécurité du médicament (Buccafusco 2008).

Par ailleurs, certains modèles permettent d'étudier de façon plus complète les effets de la pathologie et/ou du traitement. Par exemple, chez le rat, il est possible de réaliser des prélèvements de liquide céphalo-rachidien, de l'électrophysiologie, de la neuroimagerie, des manipulations de transplantations cellulaires et de réaliser des tests comportementaux complexes ce qui n'est pas ou peu possible chez la souris (Liu, Orozco et al. 2008).

Un modèle de drosophile transgénique accumule intraneuronalement le peptide $A\beta_{42}$ et développe également une perte neuronale progressive faisant de lui un modèle efficace pour tester les effets de peptidases telles que la néprilysine, enzymes potentiellement capable de dégrader le peptide $A\beta_{42}$ (Iijima and Iijima-Ando 2008). Une autre approche pour développer de nouvelles thérapies à l'aide de la drosophile est le criblage génétique. Des mutations aléatoires sont générées chimiquement ou à l'aide d'une mutagenèse

intertionnelle, puis ces mutations sont testées en fonction de leur habilité à modifier le phénotype amyloïde ou Tau (Khurana 2008).

Les modèles tels que le lapin, le chien et la souris permettent de développer de nouvelles thérapies et dans une moindre mesure les primates non humains. Les modèles souris de la MA étant très nombreux, la majorité des nouvelles thérapies sont généralement évaluées dans un premier par leur intermédiaire (Woodruff-Pak 2008).

1.2.3. Tests comportementaux

La validité prédictive de tests comportementaux peut être démontrée à l'aide de molécules connues comme étant fonctionnelles chez l'homme. Ces molécules vont alors accroître ou inhiber le comportement en question chez l'animal choisi. Par exemple, l'utilisation d'anxiolytiques ou d'anxiogéniques pour valider le test du labyrinthe en croix surélevé (Pellow and File 1986), d'antidépresseurs tricycliques pour valider un test de résignation acquise, et des amphétamines et des anticholinergiques pour valider un test de conditionnement opérant (Bensadoun, Brooks et al. 2004). La validité de la construction d'un test implique une compréhension solide des variables impliquées et de leurs effets sur les résultats mesurés. Par exemple, les performances dans le test de la piscine de Morris, décrit par la suite, sont influencées par les conditions d'éclairage, la température de l'eau, la durée de chaque essai, les durées entre chaque essai et le diamètre de la piscine (Klapdor and van der staay 1996; D'Hooge and De Deyn 2001; Van Dam, Lenders et al. 2006). Le développement de modèles complexes de la maladie nécessite en parallèle le développement ou l'optimisation de tests comportementaux valides permettant d'évaluer les relations complexes entre cerveau et comportement. De plus, les tests utilisés doivent être validés. Ils doivent être standardisés (procédures, locaux) pour les différents animaux d'expérimentation pour générer des données fiables (Wahlsten 2001).

Avec le développement de modèles de souris génétiquement modifiées présentant des déficits du SNC est arrivée l'utilisation de batteries de tests permettant d'évaluer une large variété de réponses neurologiques et comportementales. Le principal avantage de ces tests est la possibilité d'explorer des changements potentiellement corrélés au phénotype et de confirmer un phénotype cérébral particulier par différents tests et de renforcer ainsi la fiabilité du modèle. De plus, cette approche réduit le nombre de souris nécessaire. Il faut cependant tenir compte de l'effet entraînement. Celui-ci dépend de l'ordre de réalisation des différents tests comportementaux et de la souris à savoir si elle a été ou non déjà entraînée (Van Dam and De Deyn 2006).

1.2.3.1. Evaluation des symptômes cognitifs

L'amélioration des capacités cognitives peut être évaluée à différents stades d'apprentissage et de mémorisation (acquisition, consolidation et rétention) à l'aide de nombreux tests comportementaux (**Tableau 6**).

Pour évaluer l'effet d'un composé sur l'apprentissage et potentiellement sur le début de la consolidation, l'administration de la molécule s'effectue généralement avant l'essai permettant l'acquisition.

Tests	Description des tests	Symptômes évalués	Avantages	Inconvénients
Tests de navigation spatiale				
Tests « humides » (ex. test de la piscine de Morris)	Au cours de la phase d'acquisition, les animaux nagent pour trouver une plate-forme cachée en se référant à des indices visuels placés autour de la piscine. Un test de rétention dans lequel la plate-forme est retirée permet d'évaluer la rétention de l'information spatiale	Déficits d'apprentissage et de mémorisation spatiaux	<ul style="list-style-type: none"> • Test de processus cognitifs de haut niveau • Existence de contrôles internes pour évaluer les dysfonctionnements sensoriels et moteurs 	<ul style="list-style-type: none"> • Stressant pour l'animal • Fatigant pour l'animal
Tests « secs » (ex. labyrinthe radial, labyrinthe de Barnes)	Labyrinthe avec de la nourriture (labyrinthe radial) ou avec une un trou de sortie sombre (labyrinthe de Barnes) utilisés comme renforcements positifs	Déficits d'apprentissage et de mémorisation spatiaux	<ul style="list-style-type: none"> • Moins stressant • Moins fatigant • Basé sur le comportement naturel 	<ul style="list-style-type: none"> • Le labyrinthe radial nécessite une privation alimentaire
Tests d'apprentissage d'évitement passif/actif	Le stimulus est un léger choc électrique provenant du sol, ce qui conduit à un évitement de la zone après la phase d'acquisition	Déficits d'apprentissage et de mémorisation non spatiaux	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôles internes faibles pour évaluer la présence d'éventuels biais liés à des dysfonctionnements sensoriels ou moteurs
Tests d'apprentissage indicé/contextuel (ex. évaluation de la réaction d'immobilisation)	Les tests de conditionnement à la peur mesurent la capacité de l'animal à apprendre et se rappeler une association entre un stimulus aversif (par ex. choc électrique) et un stimulus environnemental (par ex. lumière, son)	Déficits d'apprentissage et de mémorisation non spatiaux	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation rapide • Basé sur le comportement naturel de survie • Ne nécessite pas une salle de test complexe 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficulté à objectiver l'immobilisation • Biais dépendants de la souche ou de l'espèce pour les capacités motrices et sensorielles
Tests d'apprentissage par association	L'animal est placé dans une cage équipée d'une manette activable (par la patte ou le museau), de stimuli lumineux et d'un distributeur de nourriture. Des protocoles évaluant le délai associé ou non-associé aux stimuli sont possibles	Déficits d'apprentissage et de mémorisation non spatiaux	<ul style="list-style-type: none"> • Test complexe et large variété de protocoles possibles • Automatisation complète • Contrôle uniquement expérimental • Très précis 	<ul style="list-style-type: none"> • Entraînement long, les expériences sont sur plusieurs mois très souvent • L'apprentissage par association est médiocre chez la souris

Tableau 6 : Tests comportementaux permettant l'évaluation de l'apprentissage et des processus de mémorisation (acquisition, consolidation et rétention) chez des modèles animaux (Van Dam and De Deyn 2006).

N.B : L'acquisition correspond à l'acquisition de nouvelles informations par le cerveau ; la consolidation est la structuration et la fixation de celles-ci voire le stockage ; la rétention est la capacité à restituer ces informations.

Par exemple, l'évaluation de la phensérine (inhibiteur de l'acétylcholinestérase) dans la maîtrise des troubles de l'apprentissage induits par la scopolamine chez le rat se fait de cette manière dans le test de la piscine de Morris (Janas, Cunningham et al. 2005).

A l'heure actuelle, le test de la piscine de Morris (Morris 1984) est le test le plus utilisé pour évaluer l'apprentissage spatial et les capacités mnésiques des rongeurs (**Figure 21**). Dans ce test, les animaux doivent apprendre la localisation d'une plate-forme cachée à l'aide d'indices visuels. Ce test se base sur l'effet aversif de l'eau sur les rongeurs qui vont ainsi chercher à en sortir par la voie la plus rapide et directe. L'apprentissage spatial est vérifié par un essai de rétention, réalisé après les autres essais, dans lequel la plate-forme est retirée ; une préférence pour l'endroit où se trouvait la plate-forme est considérée comme une mesure de la mémoire spatiale. Cet essai permet de contrôler que le rongeur a bien appris et n'a pas mis en place des stratégies particulières lors des précédents essais lui permettant d'atteindre la plate-forme sans avoir recours à sa mémoire spatiale (scanner la piscine avec des cercles concentriques d'un diamètre de plus en plus petit ou avec les différentes cordes du cercle). De plus, certains autres paramètres contrôlent l'existence de potentielles perturbations non-cognitives qui peuvent affecter la performance. C'est le cas d'une plus faible vitesse de nage ou de l'incapacité à monter sur la plate-forme lorsqu'elle est localisée par un symbole visuel clair (plate-forme visible dans le test de la piscine de Morris) qui peuvent refléter des déficits sensoriels ou moteurs. Il faut noter que le test de la piscine de Morris est un des tests cognitifs les plus stressants (D'Hooge and De Deyn 2001).

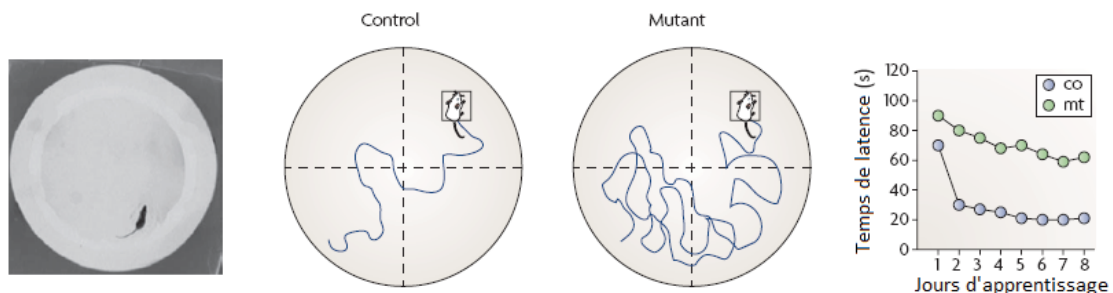


Figure 21 : Le test de la piscine de Morris évalue la mémoire spatiale. Les souris sont entraînées dans une piscine circulaire remplie d'un liquide opaque. Des indices visuels sont disposés à distance pour permettre la navigation dans la piscine. Une plate-forme est cachée juste sous la surface de l'eau. Les souris nagent jusqu'à ce qu'elles trouvent la plate-forme. Il existe différentes façons de réaliser le test et également de nombreux paramètres pour évaluer la mémoire comme la distance et le temps pour atteindre la plate-forme (temps de latence). Le test peut-être divisé en deux phases : une phase d'acquisition suivie d'une phase réverse durant laquelle la plate-forme est déplacée dans le cadran opposé (Gotz and Ittner 2008).

Pour évaluer si un composé améliore le processus de consolidation, il peut être administré immédiatement après l'essai d'acquisition. Par exemple, le test de l'apprentissage, non spatial, d'évitement passif a été utilisé pour évaluer l'action du FK962 qui est un modulateur de la dépolarisation dépendant du relargage de la somatostatine (Tokita, Inoue et al. 2005).

Dans le test de l'apprentissage d'évitement passif, lors du jour d'acquisition, l'animal est placé dans le premier compartiment de la cage qui est très lumineux. L'animal passe alors spontanément dans le second compartiment qui est quant à lui sombre. Lorsque l'animal passe dans ce second compartiment, la porte qui

sépare les deux compartiments se referme. Un léger choc électrique parcourt alors la grille qui est sur le sol de la cage. Lorsque l'on teste le processus de consolidation, on administre alors la molécule immédiatement après cet essai d'acquisition. Le test de rétention est réalisé 24 heures après et le temps de latence pour que l'animal entre de nouveau dans le compartiment noir est calculé (le seuil étant de 300 secondes) (Matsuoka, Maeda et al. 1992).

Les tests d'évitement sont très souvent utilisés pour évaluer les effets de molécules améliorant les fonctions cognitives sur une courte période. Cependant, les éléments de mémoire procédurale du test ne sont pas facilement distinguables des éléments de mémoire déclarative, comme c'est le cas dans le test de la piscine de Morris ou dans l'apprentissage contextuel et indicé (Kolb and Walkey 1987). Le temps de latence pour entrer dans le compartiment sombre durant le premier jour est le paramètre contrôle. Ceci est basé sur le fait que les animaux nocturnes tels que les rats et les souris préfèrent l'obscurité et les endroits clos plutôt que la luminosité et les larges espaces. Par contre, les dysfonctionnements sensoriels ou moteurs doivent être exclus à l'aide d'autres tests comportementaux.

Pour évaluer si un composé améliore le processus de rétention, il peut être administré avant l'essai de rétention. Par exemple, l'effet de la benzoyl-pipéridine BDP-12, modulateur des récepteurs AMPA (récepteurs ionotropes activés par le glutamate), a été évalué dans un labyrinthe radial associé à une motivation alimentaire (Staubli, Izrael et al. 1996).

Dans le test du labyrinthe radial, l'animal est placé au centre du labyrinthe et doit choisir un bras pour gagner une boulette de nourriture permettant un renforcement positif (**Figure 22**). Ce test évalue notamment la mémoire de travail. Ainsi, il a été montré que la BDP-12 favorisait la rétention d'informations lorsqu'elle était administrée avant les sessions d'entraînement, mais qu'elle ne permettait pas cela si elle était administrée uniquement avant l'essai de rétention. Les labyrinthes « secs » comme celui cité précédemment sont parfois préférés au test de la piscine de Morris qui est très stressant et physiquement éprouvant pour les animaux. Cependant, le labyrinthe radial associé à une motivation alimentaire nécessite une restriction alimentaire qui peut limiter son utilisation dans l'évaluation pharmacologique de modèles d'amyloïdose, la restriction calorique étant connue pour réduire les dépôts amyloïdes et jouer sur les performances cognitives (Patel, Gordon et al. 2005). Un autre test peut être utilisé dans ce cadre tout en étant moins stressant pour l'animal, car celui-ci ne devra être soumis à un jeûne, c'est le labyrinthe de Barnes. Ce test permet de mesurer rapidement et efficacement la mémoire de référence spatiale des rats et des souris. Le labyrinthe de Barnes est une plate-forme circulaire et éclairée, percée de petits trous le long de sa circonférence. L'un de ces trous possède une cavité où peut s'enfuir l'animal. Pour trouver ce trou, l'animal utilise des indices spatiaux situés dans la pièce. Le test est surtout conçu pour évaluer la mémoire de référence mais peut être modifié pour mesurer la mémoire de travail (de Toledo-Morrell, Morrell et al. 1984).

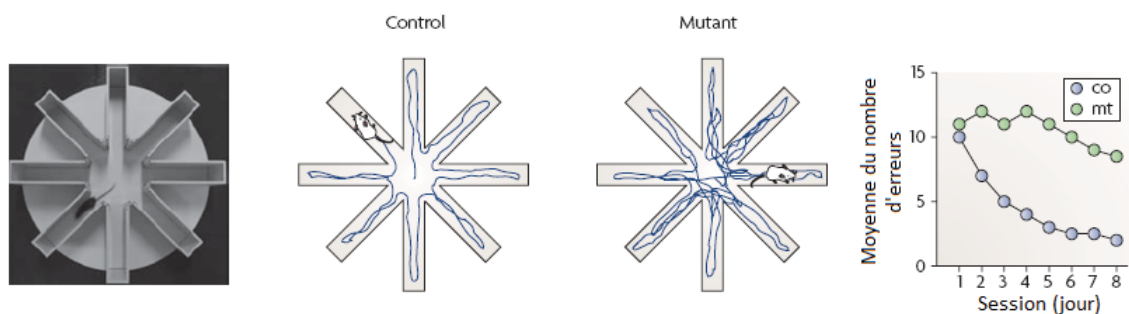


Figure 22 : Le labyrinthe radial mesure la mémoire de travail. Pendant l'entraînement, une boulette de nourriture est placée à l'extrémité de chaque bras. Pendant la phase de test, sans boulette, la souris doit aller dans chaque bras seulement une fois pour réussir complètement le test. La souris réalise cela à l'aide de sa mémoire à court terme et d'indices spatiaux afin de se rappeler quels bras ont déjà été explorés (Gotz and Ittner 2008).

1.2.3.2. Evaluation des symptômes non cognitifs

Au cours de cette dernière décennie, la recherche clinique sur la MA s'est de plus en plus intéressée aux signes psychologiques et aux symptômes de démence de la maladie. C'est pourquoi de gros efforts ont été réalisés afin de mimer les altérations comportementales spécifiques de la maladie chez les modèles animaux et de développer des outils utiles (**Tableau 7**) dans l'évaluation de nouvelles stratégies psychopharmacologiques. Ces stratégies étaient basées sur l'utilisation d'antipsychotiques et de neuroleptiques qui avaient un effet palliatif plutôt modeste sur la maladie et qui étaient souvent associés à des effets secondaires majeurs (De Deyn, Rabheru et al. 1999; De Deyn, Katz et al. 2005).

Une des altérations comportementales les plus ennuyantes chez les patients atteints de la MA est l'augmentation de leur agressivité et de leur agitation. Le développement de neuroleptiques ayant une efficacité contre l'agressivité sans effet sédatif présente un intérêt clinique évident (De Deyn, Rabheru et al. 1999; De Deyn, Katz et al. 2005). L'agressivité chez les rongeurs mâles peut être provoquée à l'aide de différents protocoles comportementaux basés sur la hiérarchie. Une des méthodes est la suivante : l'animal est stabulé dans une cage isolée pendant plusieurs semaines puis un autre mâle, avec lequel il a déjà vécu, est placé avec lui dans sa cage ou dans une nouvelle. Les comportements agonistiques commencent généralement par un contact anogénital du mâle dominant qui a la queue en mouvement et une posture défensive du mâle dominé, par la suite le dominant attaque et mord la croupe du dominé, enfin, le dominé court pour fuir.

Les modèles rongeurs de la MA présente un inconvénient majeur. En effet, plusieurs signes psychologiques et symptômes de démence de la maladie tels que la paranoïa, l'idéation délirante, les hallucinations et les troubles affectifs sont difficiles voire impossibles à modéliser chez les rongeurs. L'évaluation des symptômes liés à la dépression chez les rongeurs est basée sur le test de résignation acquise, sur des comportements de désespoir évalués par le test de nage forcée (test de Porsolt), le test de suspension par la queue pendant lesquels l'animal est soumis à un stress incontrôlable et inéluctable. Lorsque le rongeur ne cherche plus à fuir ce type de stimulus très aversif, on considère que cela modélise un état similaire à la dépression (Chourbaji, Zacher et al. 2005).

Tests	Description des tests	Symptômes évalués	Avantages	Inconvénients
Tests d'agressivité (par ex. protocole d'isolation induite suivie de l'ajout d'un intrus résident)	L'animal est stabilisé tout seul dans une cage pendant plusieurs semaines afin qu'elle devienne son territoire. Le comportement agressif (mouvement de la queue, lutte, mordant) est évalué ainsi que le temps après l'introduction d'une souris intruse	<ul style="list-style-type: none"> • Agressivité (physique) augmentée • Agitation • Irritabilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation rapide • L'enregistrement vidéo permet l'évaluation détaillée de nombreuses formes de comportement 	<ul style="list-style-type: none"> • Stressant pour l'animal
Tests des troubles de l'activité (par ex. activité dans la cage, test d'activité à l'aide d'une roue)	L'enregistrement assisté par ordinateur de l'activité sur la roue ou de l'activité locomotrice est basé sur l'interruption de rayons infrarouges entourant la cage	<ul style="list-style-type: none"> • Agitation • Troubles du rythme circadien • L'agitation nocturne, l'inversion jour-nuit, les troubles du sommeil 	<ul style="list-style-type: none"> • L'automatisation réduit la charge de travail 	<ul style="list-style-type: none"> • Des méthodes statistiques complexes sont nécessaires pour l'analyse des enregistrements
Tests de symptômes liés à la dépression (par ex. nage forcée (NF), suspension par la queue (SQ) et préférence au sucrose)	Les tests NF et SQ sont des tests d'observation basés sur le désespoir et la résignation acquise ; l'augmentation de l'immobilité est une mesure des symptômes liés à la dépression. Le test de préférence au sucrose mesure la consommation de la solution de sucrose et est basé sur l'anhédonie	<ul style="list-style-type: none"> • Désespoir émotionnel • Anhédonie 	<ul style="list-style-type: none"> • NF et SQ sont vite évalués 	<ul style="list-style-type: none"> • NF et SQ sont stressants pour l'animal • Difficulté pour évaluer la dépression chronique et cyclique de l'homme de façon analogue chez le rongeur
Tests d'anxiété / de peur (par ex. le labyrinthe surélevé en croix (LSC), cage avec compartiments sombre et lumineux (CCSL), exploration libre)	Test basé sur des situations contradictoires (bras ouverts versus bras fermés dans le LSC ; obscurité versus luminosité dans la CCSL). Une exploration et un thigmotaxisme (tendance à rester sur les bords de l'arène) diminués peuvent indiquer une anxiété diminuée	<ul style="list-style-type: none"> • Anxiété et phobie 	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation rapide • L'automatisation réduit la charge de travail • Basé sur le comportement naturel 	<ul style="list-style-type: none"> • L'anxiété peut être affectée par une manipulation répétée des animaux

Tableau 7 : Tests comportementaux permettant l'évaluation des signes psychologiques et des symptômes de démence liés à la MA chez des modèles animaux (Van Dam and De Deyn 2006).

L'anhédonie (incapacité d'un sujet à ressentir des émotions positives lors de situations de vie pourtant considérées antérieurement comme plaisantes), un symptôme central de la dépression clinique, est évalué chez les rongeurs avec le test de préférence au sucrose pendant lequel la consommation d'une solution de

sucrose à 0,8 % est comparée simultanément à la consommation d'une solution d'eau du robinet (Sanchis-Segura, Spanagel et al. 2005).

1.3. Cholestérol et maladie d'Alzheimer

Si la physiopathologie de la maladie reste encore mal connue, le cholestérol joue probablement un rôle crucial dans son développement. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'étroites connexions entre la MA et le cholestérol.

1.3.1. Le cholestérol dans la maladie d'Alzheimer

Toutes les protéines impliquées dans la formation de peptides A β sont des protéines membranaires. L'environnement lipidique de ces dernières joue donc potentiellement un rôle dans la pathogenèse de la MA (Grziwa, Grimm et al. 2003).

1.3.1.1. Aspects épidémiologiques

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque identifié dans le développement de la pathologie amyloïde (Kivipelto, Helkala et al. 2001). Des études suggèrent que des quantités élevées de cholestérol dans le cerveau seraient un facteur de risque majeur associé au développement de maladies neurodégénératives telles que la MA (Morris 2009; Ramesh, Rao et al. 2010). De plus, il a été montré que la quantité de cholestérol intracérébral augmentait au début de la maladie (Wood, Schroeder et al. 2002; Cutler, Kelly et al. 2004). Des études rétrospectives ont montré qu'un traitement par les statines était associé avec un risque réduit de MA (Jick, Zornberg et al. 2000; Wolozin, Kellman et al. 2000; Rockwood, Kirkland et al. 2002). Les études prospectives donnent quant à elles des résultats variables (Simons, Schwarzler et al. 2002; Hoglund, Wiklund et al. 2004; Sparks, Sabbagh et al. 2005).

1.3.1.2. Aspects génétiques

Différentes analyses et méta-analyses ont pu établir l'existence de gènes associés à un risque plus élevé de développer la MA, en particulier des gènes impliqués dans le transport du cholestérol.

L'**allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE*** est le facteur de risque génétique le mieux établi pour les formes sporadiques de MA (99 % des cas). Le risque lié à $\epsilon 4$ (estimé par l'odds-ratio) est augmenté d'un facteur quatre à dix, le risque étant plus important pour les sujets porteurs de deux allèles.

ABCA1, transporteur qui facilite le relargage du cholestérol du compartiment intracellulaire vers le milieu extracellulaire, présente des variants pathogéniques associés avec la MA. L'inhibition d'ABCA1 stimulerait la voie amyloïdogénique de l'APP (Liu, Tang et al. 2010).

ABCA7 présente des variants génétiques associés à la MA, récemment découverts par croisement de quatre études d'association génome entier. ABCA7 est exprimé principalement dans les neurones de la région hippocampique CA1 et contribue en partie à l'excrétion du cholestérol (Hollingworth, Harold et al. 2011).

La **cholestérol acétyltransférase (ACAT)** catalyse la formation d'esters de cholestérol à partir du cholestérol et d'acyl coenzyme A (**Figure 24**). Une diminution de l'activité de l'ACAT, codée par le gène SOAT1,

a un effet protecteur sur la MA (Bertram, McQueen et al. 2007). Cet effet a également été montré *in vivo* chez un modèle animal transgénique de la maladie présentant la composante amyloïde (Hutter-Paier, Huttunen et al. 2004).

1.3.1.3. Etudes *in vitro* et *in vivo*

1.3.1.3.1. Cholestérol et composante amyloïde

In vitro, les peptides A β s'agrègent préférentiellement lorsqu'ils sont liés au cholestérol (Avdulov, Chochina et al. 1997). De plus, ce dernier induit la production de peptides A β en activant l'activité de la γ -sécrétase (Wahrle, Das et al. 2002; Zha, Ruan et al. 2004).

La diminution de la quantité de cholestérol induite par les statines, le BM15.766 ou la cyclodextrine dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, réduit de façon forte et réversible la quantité de peptides A β (Fassbender, Simons et al. 2001; Refolo, Pappolla et al. 2001; Hartmann, Kuchenbecker et al. 2007).

Un régime enrichi en cholestérol entraîne une augmentation de la surcharge amyloïde dans plusieurs modèles animaux (Refolo, Pappolla et al. 2001; Shie, Jin et al. 2002; Sparks, Sabbagh et al. 2005).

Le lien entre le peptide A β et le cholestérol a été largement étudié comme le montrent les études évoquées dans les paragraphes précédents. Celui avec la protéine Tau a été quant à lui moins exploré, les connaissances sont donc moins importantes à ce sujet.

1.3.1.3.2. Cholestérol et composante Tau

Un lien entre Tau et lipides a été montré *in vitro*. Tau interagit avec la membrane plasmique, composée de lipides et de cholestérol, par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal. Ainsi, la protéine Tau est un médiateur des interactions microtubules - membrane plasmique (Brandt, Leger et al. 1995). Cette fonction qui contribue au développement neuritique pourrait être perturbée dans la MA.

Tau pourrait interagir avec les membranes cellulaires de façon indirecte par l'intermédiaire de protéines liées aux membranes telles que des kinases de la famille Src (famille de non-récepteurs tyrosine-kinases). Parmi ces kinases, Fyn, Lck, cSrc et Fgr se lieraient à Tau par l'intermédiaire de leur domaine SH3 (**Figure 23**). Un niveau élevé de phosphorylation de Tau pourrait compromettre ces interactions protéiques.

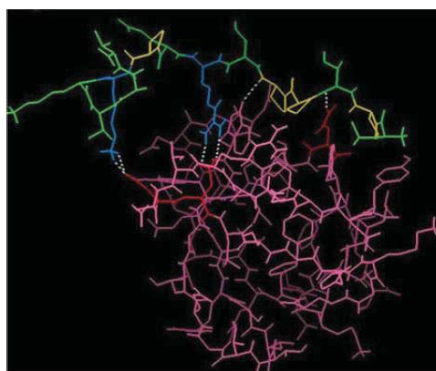


Figure 23 : Structure du domaine SH3 de Fyn se liant à Tau 215-225. En rose : structure SH3 ; en vert : peptide Tau ; en bleu : arginine et lysine chargées positivement ; en jaune : prolines (Reynolds, Garwood et al. 2008).

In vitro Tau peut s'associer aux radeaux lipidiques neuronaux (micro-domaines particuliers de la membrane plasmique, riches en cholestérol et en sphingolipides). Au sein de ces radeaux, Fyn puis Cdk5/p35 phosphorylent anormalement Tau sous l'induction du peptide A β ₂₅₋₃₅ (forme à effets neurotoxiques plus rapide que la forme 1-42) (Hernandez, Lee et al. 2009). La protéine Tau axonale est capable de séquestrer Fyn en région somatodendritique. Cette liaison Fyn-Tau dans les épines dendritiques contribue à l'excitotoxicité, par l'intermédiaire des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Fyn étant une protéine membranaire, cette excitotoxicité est probablement modulée par la délocalisation de Fyn et de Tau dans les radeaux lipidiques (Williamson, Usardi et al. 2008; Ittner, Ke et al. 2010).

Un autre lien Tau-cholestérol passe par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). En effet, cette kinase joue un rôle important dans le métabolisme lipidique en réprimant la synthèse du cholestérol. Parallèlement, elle est capable d'inhiber la phosphorylation de Tau et son agrégation par l'intermédiaire de l'activation de SIRT1 (protéine intracellulaire régulatrice) et de l'inhibition de la GSK-3 β . Un défaut d'activation de l'AMPK conduirait à l'accumulation de cholestérol et contribuerait à la formation de l'angiopathie cérébrale amyloïde dans la MA (Salminen, Kaarniranta et al. 2011).

In vivo, un régime riche en cholestérol induit une diminution de l'activité de l'AMPK (Lu, Wu et al. 2010). *A contrario*, les statines, dont on a vu qu'elles réduisent le nombre de plaques séniles et la production de peptides A β , réduiraient également l'hyperphosphorylation de Tau (Lu, Li et al. 2010; Kurata, Miyazaki et al. 2011; Sierra, Ramos et al. 2011).

Par ailleurs il a été montré que l'exercice, en modulant les fonctions de NPC1 et NPC2 (Niemann-Pick disease type C), protéines liées au cholestérol, réduit la pathologie Tau en contribuant probablement à la dégradation de la protéine Tau pathologique (Belarbi, Burnouf et al. 2011).

1.3.2. Métabolisme intracérébral du cholestérol : CYP46A1 enzyme clé

Chez les Mammifères, le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol. Le cerveau humain contient près de 25 % du cholestérol total et des dérivés de cholestérol (environ 20 mg/g) alors qu'il ne représente que 2 % du poids corporel total (Dietschy and Turley 2004; Vaya and Schipper 2007).

Dans le cerveau adulte, le cholestérol cérébral est entièrement synthétisé *in situ* par les astrocytes. Les astrocytes permettent l'approvisionnement des neurones en cholestérol en l'exportant par l'intermédiaire du transporteur membranaire ABCA1 (ATP-binding cassette 1) et complexé à l'ApoE (**Figure 24**). Le cholestérol joue un rôle essentiel dans la régulation de la fluidité membranaire synaptique. Sa concentration intraneuronale doit être finement régulée. Le cholestérol en excès dans le cerveau ne peut être directement excrété, celui-ci ne passant pas la barrière hémato-encéphalique. Il doit être d'abord métabolisé en 24S-hydroxycholestérol, un oxystérol plus hydrophile, qui lui est capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Cette étape clé est catalysée par la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46A1), un cytochrome P450 exprimé dans les neurones (Liu, Tang et al. 2010). Une des enzymes clés intervenant dans la synthèse de

cholestérol est la méthylglutaryl-CoA réductase (HMGR) qui catalyse la formation de mévalonate (Butterfield, Barone et al. 2011).

Le cholestérol joue un rôle essentiel dans la régulation de la fluidité membranaire synaptique. Sa concentration intraneuronale doit être finement régulée. Le cholestérol en excès dans le cerveau ne peut être directement excrété, celui-ci ne passant pas la barrière hémato-encéphalique. Il doit être d'abord métabolisé en 24S-hydroxycholestérol, un oxystérol plus hydrophile, qui lui est capable de passer la barrière hémato-encéphalique. Cette étape clé est catalysée par la cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1), un cytochrome P450 exprimé dans les neurones.

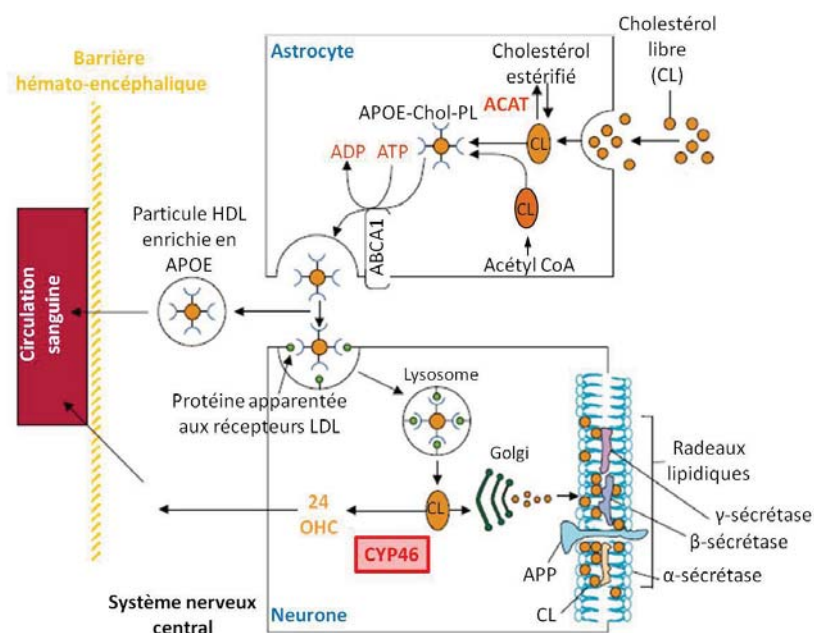


Figure 24 : Représentation schématique du transfert de cholestérol entre astrocytes et neurones. Chol : cholestérol ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; LDL : lipoprotéine de faible densité ; PL : phospholipides (Shobab, Hsiung et al. 2005).

La quantité de 24S-hydroxycholestérol mesurée dans la circulation de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives et notamment de MA est significativement diminuée par rapport à des individus sains (Kolsch, Heun et al. 2004; Koschack, Lutjohann et al. 2009; Solomon, Leoni et al. 2009). La concentration plasmatique en 24S-hydroxycholestérol serait donc proportionnelle à la masse de neurones métaboliquement actifs. Cet oxystérol pourrait donc être utilisé en tant que marqueur d'atrophie cérébrale chez des patients atteints de MA (Leoni and Caccia 2011).

CYP46A1 joue donc un rôle clé dans la régulation du métabolisme intracérébral du cholestérol. Ce rôle est confirmé par l'existence de sévères défauts d'apprentissage spatial, associatif et moteur chez les souris KO pour le gène (Kotti, Ramirez et al. 2006).

L'objectif général du laboratoire où j'ai réalisé cette étude (INSERM UMR_745) est d'évaluer, dans des modèles murins présentant une composante amyloïde ou une composante Tau de la pathologie de la

maladie d'Alzheimer, si la modulation du cholestérol intracérébral via la surexpression de CYP46A1 pourrait constituer une cible thérapeutique pertinente pour la MA.

Dans ce but, et en l'absence d'agoniste de CYP46A1 capable de franchir la barrière hémato-encéphalique ou d'activateur pharmacologique, la stratégie repose sur l'injection intracérébrale de vecteur viral adéno-associé (AAV) permettant de faire surexprimer le gène *CYP46A1 in situ* dans le cerveau. Un travail antérieur, réalisé dans ce même laboratoire, a montré que l'injection intracérébrale de vecteur AAV codant pour le gène *CYP46A1* avait un effet bénéfique sur la pathologie amyloïde développée par la souris APP23 qui exprime la protéine humaine APP portant la double mutation suédoise (K670N / M671L) sous le contrôle du promoteur Thy1 (Hudry, Van Dam et al. 2010).

Mon projet de recherche a visé à évaluer les effets de la surexpression du gène *CYP46A1* par la même stratégie dans un modèle murin de tauopathie.

1.4. Modulation de l'expression de CYP46A1 dans la souris THY-Tau22 via l'utilisation d'un vecteur viral adéno-associé codant pour le transgène *CYP46A1*

1.4.1. Choix de l'utilisation d'un vecteur AAV

Parmi les vecteurs de transfert de gènes aujourd'hui disponibles, les vecteurs viraux adéno-associés (AAV) sont couramment utilisés, particulièrement pour les applications dans le système nerveux central (SNC). Ils sont en effet non toxiques, peu immunogènes, et permettent une expression stable du transgène dans le SNC (Kootstra and Verma 2003; Burger, Gorbatyuk et al. 2004) .

Les vecteurs AAV sont dérivés du parvovirus humain (non pathogène) dont le génome est constitué d'un ADN simple brin. Il existe de nombreux sérotypes présentant des tropismes tissulaires spécifiques ; les rAAV1, 2, 5, 8, 9 et 10 sont les plus couramment utilisés. De plus, ils diffusent assez efficacement dans le cerveau et transduisent de façon privilégiée les neurones (Burger, Gorbatyuk et al. 2004). Le génome de ces AAV recombinants ne s'intègre pas ou peu, réduisant ainsi le risque de mutagenèse insertionnelle (Buning, Perabo et al. 2008). Différents sérotypes d'AAV sont actuellement utilisés dans le cadre d'essais cliniques de thérapie génique chez l'homme (Mendell, Rodino-Klapac et al. 2010; Muramatsu, Fujimoto et al. 2010; Flotte, Trapnell et al. 2011).

Pour notre projet, nous avons choisi de construire et d'injecter, par voie stéréotaxique, dans le cerveau de souris modèles de tauopathie, un vecteur AAV5 portant le gène *CYP46A1* humain. Les régions cérébrales que nous avons ciblées sont précocement atteintes par la pathologie (cortex et hippocampe).

1.4.2. Le modèle murin THY-Tau22

1.4.2.1. Description du modèle

Le modèle de pathologie Tau que j'ai choisi d'utiliser pour mon travail est la souris THY-Tau22, développée par l'équipe de Luc Buée. Cette souris a l'avantage de ne pas présenter les déficits moteurs et la

parésie existant dans les précédents modèles de souris Tau créés, éléments non spécifiques qui perturbaient l'analyse comportementale des animaux (Schindowski, Bretteville et al. 2006). Ce modèle a été créé dans le but d'étudier la pathogénie liée à l'accumulation de protéines Tau phosphorylées dans le cerveau et les effets qui en découlent d'un point de vue pathologique dans la MA.

La souris transgénique THY-TAU22 exprime une protéine Tau humaine à 4 motifs répétés dans la séquence de son domaine de liaison aux microtubules. Cette protéine Tau présente les mutations G272V et P301S sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Ces souris sont générées à l'aide de l'isoforme humaine Tau 46, forme la plus commune dans le cerveau humain et chez les rongeurs. La mutation G272V se situe dans la séquence du premier domaine de liaison aux microtubules chez toutes les isoformes. La mutation P301S se situe quant-à-elle dans la séquence du second domaine de liaison des isoformes Tau 4R (**Figure 25**).

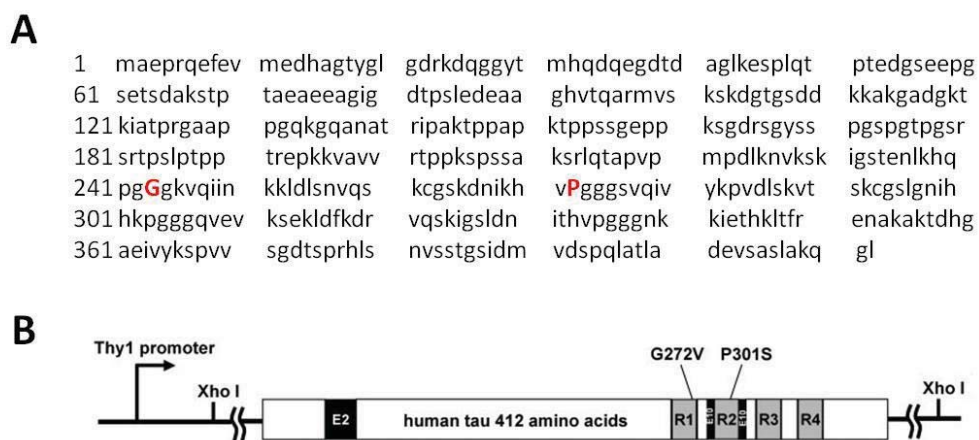


Figure 25 : A : Séquence aminée de l'isoforme humaine Tau 46 (NCBI). En rouge, les acides aminés mutés du transgène. B : Double mutant de la Tau humaine de 412 acides aminés. Les exons 2 et 10 sont symbolisés par les boîtes noires et les domaines de liaison aux microtubules par les grises. La numérotation officielle pour les mutations de Tau est basée sur l'isoforme contenant 441 acides aminés.

L'expression du transgène Tau se fait essentiellement dans le cerveau. En effet, le promoteur Thy1.2 permet une forte expression du transgène dans les neurones et plus particulièrement les neurones moteurs. Les chercheurs ont contourné ce problème en sélectionnant des lignées de souris présentant une faible expression du transgène dans la moelle spinale pour éviter notamment les déficits moteurs (**Figure 26**).

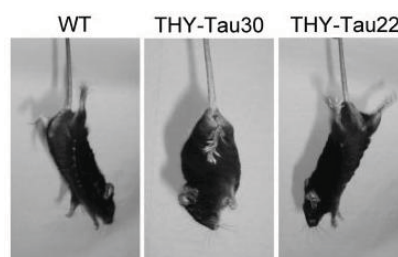


Figure 26 : Test de préhension chez une souris transgénique de 10 mois de la lignée 30 (THY-Tau30) présentant une paralysie des postérieures, une souris de la lignée 22 (THY-Tau22) et une souris sauvage (WT).

Les souris présentent une hyperphosphorylation et une phosphorylation anormale de Tau *a priori* irréversible sur des sites similaires à ceux principalement impliqués dans la MA (**Figure 27**, **Figure 28**).

L'augmentation de la phosphorylation de Tau liée à l'âge décrite chez le modèle est comparable à celle trouvée dans le cerveau de patient atteint de la MA pour différents stades de Braak.

Le modèle THY-Tau22 développe une tauopathie à partir de 3 mois, ce qui est plutôt précoce par rapport aux autres modèles de souris transgéniques. La variabilité entre chaque individu est très faible. La tauopathie débute dans la région hippocampique CA1 et dans le cortex (**Figure 28**). L'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de Tau augmentent avec l'âge. A 6 mois, la pathologie a atteint le gyrus denté et présente davantage d'inclusions similaires à des corps neurofibrillaires. A 10 mois, les processus dégénératifs commencent et à 14 mois le stade final de neurodégénérescence est atteint, accompagné d'une perte des fonctions synaptiques. Le modèle ne présente cependant qu'une astrogliose modérée. Ces modifications sont bien évidemment accompagnées de déficits cognitifs.

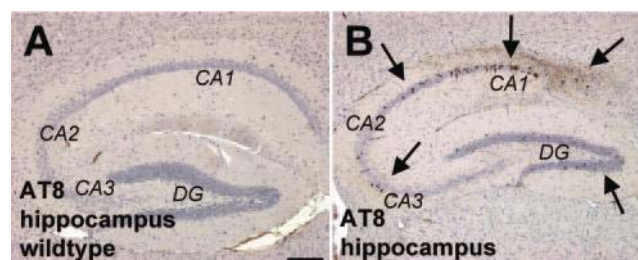


Figure 27 : Accumulation de protéine Tau pathologique dans l'hippocampe chez des souris THY-Tau22 de 12 mois (B) comparées à des souris sauvages (A). Les flèches mettent en évidence les points les plus représentatifs. L'hyperphosphorylation de Tau est identifiée avec la coloration marron (anticorps AT8).

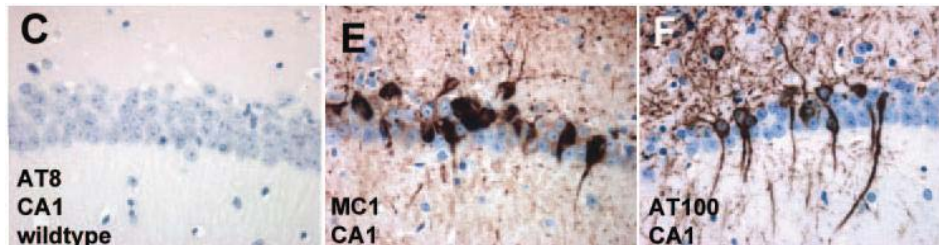


Figure 28 : Accumulation de protéine Tau pathologique dans la région CA1 de l'hippocampe chez des souris THY-Tau22 de 12 mois (E et F) comparées à une souris sauvage (C). L'hyperphosphorylation de Tau est identifiée avec la coloration marron (anticorps AT8 pour C et anticorps AT100 pour F). MC1 permet de détecter la phosphorylation anormale de Tau (E).

Les déficits cognitifs ont été évalués tout d'abord dans le test de la piscine de Morris. A partir du 2^{ème} et 3^{ème} jour d'entraînement de la phase d'acquisition du test, les souris THY-Tau22 de 3, 10 et 14 mois d'âge présentent un retard d'apprentissage par rapport aux souris sauvages. Lors de la phase de rétention, seules les souris THY-Tau22 de 10 et 14 mois présentent un déficit par rapport aux souris sauvages (**Figure 29**).

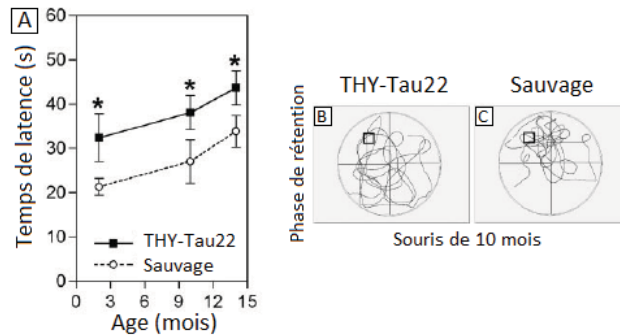


Figure 29 : Apprentissage retardé et mémoire diminuée chez les souris THY-Tau22. A : Temps de latence dans le test de la piscine de Morris chez des souris THY-Tau22 et sauvages de 3, 10 et 14 mois d'âge au cours du 3^{ème} jour d'entraînement. Les souris THY-Tau22 présentent un retard d'apprentissage (analyse de variance à deux voies ; ** $p = 0,01$ pour le génotype ; * $p = 0,05$ pour l'âge ; $n = 8$ par groupe). B et C : Trajets représentatifs des souris dans la piscine au cours de la phase de rétention (Schindowski, Bretteville et al. 2006).

De plus, les souris THY-Tau22 âgées de 9 à 10 mois présentent également des troubles de la mémoire à court terme dans le test du labyrinthe en Y (Van der Jeugd, Ahmed et al. 2011).

Enfin, ce modèle présente de nombreuses caractéristiques pathologiques qui se rapprochent davantage de la MA que des autres tauopathies comme la phosphorylation de Tau sur la sérine 262 par exemple. Par ailleurs, les neurones contenant la protéine Tau phosphorylée sur la sérine 202 et la thréonine 205 semblent davantage susceptibles à la dégénérescence. Ceci est également observé dans des cerveaux de patients atteints de la MA.

1.4.2.2. Mutations du transgène humain Tau

1.4.2.2.1. Mutation G272V

Cette mutation est une mutation faux-sens localisée dans l'exon 9 du gène Tau. Elle peut toucher toutes les isoformes de Tau.

D'un point de vue clinique, elle correspond à une démence fronto-temporale héréditaire ou « maladie de Pick familiale ». Les individus développent la maladie vers 46 ans, la mort survenant vers les 54 ans. Cette maladie peut durer entre 4 et 16 ans avant d'entraîner la mort. Les symptômes sont : désinhibition, agressivité et/ou comportement obsessionnel puis, plus tardivement, hyperoralité (changement d'habitudes alimentaires, augmentation des prises alimentaires, lubies alimentaires, consommation excessive de tabac ou de boissons alcoolisées, exploration orale des objets), errance, agitation, perte du langage (<http://www.alzforum.org>).

D'un point de vue neuropathologie, les patients présentent une atrophie des lobes frontotemporaux, une perte neuronale dans l'hippocampe et le noyau caudé. Des « cellules ballonnées » sont observables dans le cortex et dans les noyaux gris centraux. Des inclusions contenant la protéine Tau sont présentes dans de nombreuses régions corticales et subcorticales. De plus, les cellules granulaires du gyrus denté contiennent de nombreux corps de Pick. La composition biochimique des corps de Pick varie en fonction des mutations impliquées. Dans cette maladie, ils seraient essentiellement constitués d'isoformes avec 3 domaines de liaison aux microtubules. Dans ces corps, la protéine Tau n'est pas phosphorylée sur la sérine 262 (Bronner, ter Meulen et al. 2005).

1.4.2.2.2. Mutation P301S

Cette mutation est localisée dans l'exon 10 du gène Tau. Elle peut toucher toutes les isoformes de Tau (<http://www.alzforum.org>).

Cette démence se développe très rapidement entre 30 et 40 ans. En 2005, seules cinq familles étaient répertoriées comme porteuses de la mutation : deux allemandes, deux japonaises et une italienne. La maladie se caractérise par une démence fronto-temporale ou une dégénérescence cortico-basale indépendamment de la famille d'origine.

Cette mutation contribue à diminuer considérablement la capacité de la protéine Tau à se lier aux microtubules, de la même façon que la mutation P301L.

Cette tauopathie semble beaucoup plus agressive que celles présentant d'autres mutations de Tau. En effet, l'assemblage en filaments de protéine Tau hyperphosphorylée est très rapide et extensif (Lossos, Reches et al. 2003; Baba, Tsuboi et al. 2005).

1.5. Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude a donc été de tester si la surexpression de CYP46A1 pouvait également jouer sur la seconde caractéristique pathologique de la MA, la pathologie Tau.

Un vecteur AAV de sérotype 5 codant pour une enzyme CYP46A1 fonctionnelle ou non-fonctionnelle a été injecté par voie stéréotaxique dans le cortex et l'hippocampe de souris THY-Tau22. Les injections ont été réalisées à 3,5 mois, au début de la pathologie Tau.

Mon travail de recherche a consisté à évaluer, 6 mois plus tard, les effets de la surexpression intracérébrale de CYP46A1 sur les capacités mnésiques de ces souris mais également sur l'hyperphosphorylation globale et pathologique de Tau qui caractérise ce modèle.

2. Matériels et méthode

2.1. Production du stock viral

Les plasmides PAAV5-PGK-HAhCYP^{wt}-WPRE-BGHpolyA et PAAV5-PGK-HAhCYP^{mut}-WPRE-BGHpolyA contiennent les séquences ITR (séquences Terminales Répétées en orientation Inverse) gauche et droite de l'AAV5, le promoteur murin PGK (PhosphoGlycerate Kinase), le gène *CYP46A1* humain sauvage fonctionnel dans le premier cas et muté inactif dans le second (comportant la mutation A1309C), l'étiquette HA (human influenza HemAgglutinin), la séquence régulatrice WPRE (Woodchuck Hepatitis Post-transcriptional Regulatory Element) et la séquence poly A (BGH poly A pour bovine growth hormone polyadenylation signal sequence) (**Figure 30**).

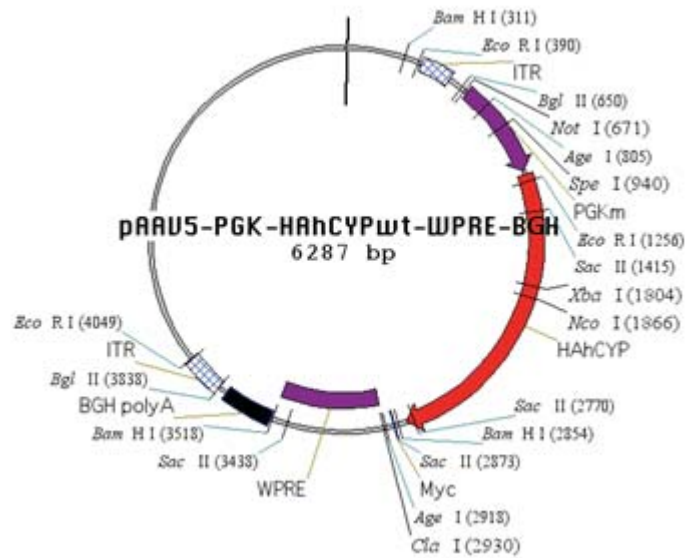
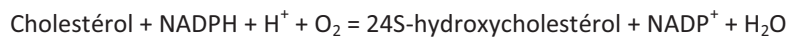


Figure 30 : Plasmide pAAV5/PGK (CYPwt).

L'enzyme CYP46A1 contient un groupement hème positionné entre deux hélices α et lié à la cystéine 437 de la protéine (Russell, Halford et al. 2009). Cette enzyme réalise la réaction d'oxydo-réduction suivante :



Cette réaction est permise par le groupement hème contenant un atome de fer qui est réduit ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- = \text{Fe}^{2+}$). La mutation A1309C du gène *CYP46A1* humain conduit à la présence d'un autre acide aminé en position 437 : la cystéine devient une glycine. Dans ce cas, la liaison à l'hème n'est plus possible ce qui inactive complètement l'enzyme. Elle ne peut plus se lier au cholestérol ni le métaboliser.

Les deux plasmides portant le gène codant pour *CYP46A1* sauvage pour l'un et mutant pour l'autre ont été donnés par la société Sanofi-Aventis-France. Les plasmides pAAV5-PGK-HAhCYPwt-WPRE-BGHpolyA et pAAV5-PGK-HAhCYPmut-WPRE-BGHpolyA ont été clonés. A partir de ces plasmides, les vecteurs AAV ont été produits dans le laboratoire de P. Moullier à Nantes (INSERM UMR_649). Les titres finaux des vecteurs étaient de 9.10^{12} particules physiques par ml pour le vecteur AAV-CYPwt et de 4.10^{12} particules physiques par ml pour le vecteur AAV-CYPmuté.

2.2. Modèles animaux

Les souris THY-Tau22 nous ont été données par Luc Buée (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Centre Jean-Pierre Aubert, Lille, France) (Schindowski, Bretteville et al. 2006).

Les animaux sont en groupe de 6 par cage et placés dans une pièce thermostatée ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) suivant un nyctémère de 12 heures avec un cycle lumineux commençant à 8h00. La nourriture et l'eau sont disponibles à volonté.

2.3. Génotypage des souris

Des prélèvements de queue de souris ont été réalisés afin de pouvoir les génotyper.

2.3.1. Extraction d'ADN

Tout d'abord, les queues de souris ont été lysées. Elles ont été mises à incuber toute la nuit à 56°C dans 400 µl de tampon de lyse (100 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8 et 0,25 % SDS) auquel de la protéinase K a été ajoutée (concentration finale de 0,5 mg/ml).

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée le lendemain matin à l'aide de la solution « protein solution precipitation » (QIAGEN®) de la façon suivante :

- Ajout de 100 µl de solution de précipitation aux queues lysées,
- Mélange vigoureux (20 s) puis centrifugation (13 krpm, 4°C, 5 min),
- Prélèvement du surnageant et ajout de 300 µl d'isopropanol,
- Mixage par inversion (environ 50 fois),
- Centrifugation (13 krpm, 4°C, 5 min),
- Elimination de l'isopropanol et préservation du culot d'ADN,
- Lavage avec 300 µl d'éthanol 70 % puis centrifugation (13 krpm, 4°C, 5 min),
- Elimination de l'éthanol et séchage des culots à température ambiante,
- Reprise des culots dans de l'eau stérile sans DNase puis resuspension avant congélation à -20°C.

2.3.2. PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification d'un fragment d'un gène d'intérêt. Le gène qui a été amplifié ici est le gène Tau humain (*MAPT* Hs). Voici les séquences des amorces utilisées :

Gènes	Séquence sens	Séquence anti-sens
<i>MAPT</i> Hs	5' CAT ATG CCA CCC ACC CGG GAG 3'	5' TCA CCC GTG GTC TGT CTT GGC 3'

Pour réaliser la PCR, le mélange réactionnel suivant a été effectué, pour un puits :

	Volume
Amorce sens 10 µM	2 µl
Amorce anti sens 10 µM	2 µl
Eau stérile DNase free	5 µl
Taq polymérase	REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix Sigma-Aldrich® 10 µl

19 µl de ce mélange ont été déposés par puits puis 100 ng d'ADN (1 µl à 100 ng/µl). Le programme de PCR s'est déroulé dans un thermocycleur de type GeneAmp PCR system 9700® (Perkin-Elmer AppliedBiosystems) avec les conditions suivantes :

- Dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C,
- 25 cycles :
 - o Dénaturation de 1 min à 94°C,
 - o Hybridation de 1 min à 55°C,
 - o Elongation de 1 min à 72°C,
- Extension finale de 10 min à 72°C.

Le génotype a été déterminé par un dépôt sur gel d'agarose, puis migration à 100 V pendant 50 min et révélation par le BET.

2.4. Injections intracérébrales de vecteurs AAV5-CYPwt et AAV5-CYPmuté

Les souris THY-Tau22 et littermates ont été anesthésiées par injection intra péritonéale de kétamine/xylazine (0,1/0,05 g/kg respectivement) puis positionnées sur un cadre d'injection (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA).

Le volume de vecteur injecté a été de 2 µl par site d'injection à la vitesse de 0,2 µl/min. Les injections ont été réalisées avec une aiguille de 30 G montée sur une seringue Hamilton de 10 µl (Reno, NV, USA).

Des injections de vecteur AAV5-CYPwt (**AAV-CYP WT**) ont été faites dans le cortex cérébral et l'hippocampe de 17 souris THY-Tau22 et de 13 souris littermates âgées de 3,5 mois. De même, des injections de vecteur AAV5-CYPmuté (**AAV-CYP muté**) ont été faites dans le cortex cérébral et l'hippocampe de 11 souris THY-Tau22 et de 10 souris littermates âgées de 3,5 mois. Chaque souris a reçu une injection de vecteur AAV dans l'hippocampe et une injection de vecteur AAV dans deux régions distinctes du cortex cérébral (**Figure 31**).

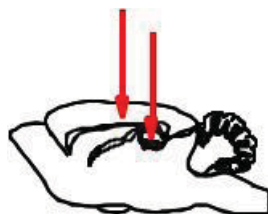


Figure 31 : Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de souris. Les deux flèches rouges symbolisent le trajet des aiguilles lors de l'injection.

Les coordonnées stéréotaxiques de ces injections sont indiquées ci-dessous :

Lieux d'injection	Coordonnées à partir du bregma		Quantité totale / site
Cortex préfrontal	AP	- 0,3 mm	1,2×10 ⁹ pp
	ML	± 2 mm	
	DV	- 1,5 mm	
Cortex frontal	AP	- 2 mm	1,2×10 ⁹ pp
	ML	± 1,2 mm	
	DV	- 1,2 mm	
Hippocampe	AP	- 2 mm	1,2×10 ⁹ pp
	ML	± 1,2 mm	
	DV	- 2 mm	

AP : antéro-postérieur ; ML : médio-latéral ; DV : dorso-ventral ; pp : particules physiques.

Bregma : Repère anatomique correspondant au point de réunion de la suture sagittale et la suture coronale. Il sert d'origine pour les coordonnées stéréotaxiques (**Figure 32**).

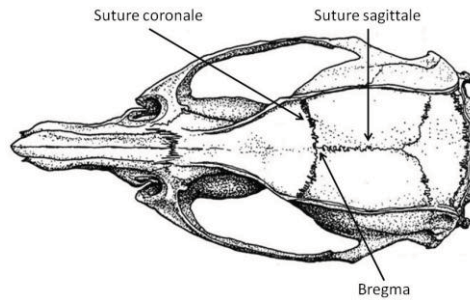


Figure 32 : Vue dorsale d'un crâne de rat et localisation du bregma.

(George Paxinos et Charles Watson : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, New York, 1998)

2.5. Test de mémoire de référence spatiale : la piscine de Morris

2.5.1. Descriptif de la piscine de Morris

La piscine de Morris est un réservoir circulaire de 140 cm de diamètre et de 50 cm de hauteur aux parois non réfléchissantes, remplie par une eau rendue opaque par addition d'opacifiant (ACUSOL™) et maintenue à une température comprise entre 21-23°C. La luminosité au centre de la piscine a été réduite à 10 lux afin de réduire l'effet aversif d'une intensité lumineuse trop soutenue. Des indices visuels extra-piscine à fort contraste ont été positionnés sur les murs de la pièce afin de permettre à l'animal d'avoir des points de repères spatiaux et ainsi permettre la mise en place d'une carte mentale de cet environnement (**Figure 33**). Une plate-forme (ou cible) de 12 cm de diamètre est ensuite placée dans la piscine (ratio de surface entre la piscine et la plate-forme : 11,66) et recouverte par 0,5-1 cm d'eau.



Figure 33 : Vue panoramique (360°) des indices visuels environnant la piscine.

L'acquisition des données brutes est réalisée à l'aide d'un système de capture d'image surplombant le bassin et relié à un ordinateur équipé du logiciel d'analyse Smart Junior de Panlab®.

2.5.2. Protocole expérimental

Afin de maintenir un contexte constant au cours de l'apprentissage et de réduire l'effet anxiogène de la manipulation, il est crucial que l'intégralité des phases du test (habituation, apprentissage et rétention) soient réalisées par le même expérimentateur. J'ai donc réalisé moi-même l'ensemble du test. Toutes les souris injectées ont été soumises au test. De plus, au cours du test, les cages des souris n'ont pas été changées afin de ne pas perturber ces dernières. Ce paramètre est également très important.

2.5.2.1. Phase d'habituation

Le but de cette première étape est de familiariser les souris au nouvel environnement que constitue la piscine de Morris, c'est-à-dire les habituer au contexte ainsi qu'à la présence d'une plateforme immergée dans

la piscine. Elle permet également la mise en place de la mémoire dite procédurale : apprentissage moteur de la nage et de la montée sur la plate-forme indispensable (**Figure 34**).



Figure 34 : Souris dans la piscine de Morris nageant et en attente sur la plate-forme.

<http://www.sci.uidaho.edu/biosci/labs/magnusson/research/index.html>

<http://ea4306anacomp.free.fr/?tag=apprentissage>

Au cours de cette phase, les souris ont été déposées dans la piscine museau face à la paroi. Après 15 secondes de nage libre, les souris ont été gentiment guidées jusqu'à la plate-forme où elles restaient pendant 15 secondes supplémentaires.

2.5.2.2. Phase d'apprentissage spatial

Le protocole de mémoire de référence spatiale à proprement parler consiste en 5 jours d'apprentissage. Chaque jour, l'animal a disposé de quatre essais pour mémoriser la position de la plate-forme qui est constante pendant toute la durée de l'apprentissage (**Figure 35**).

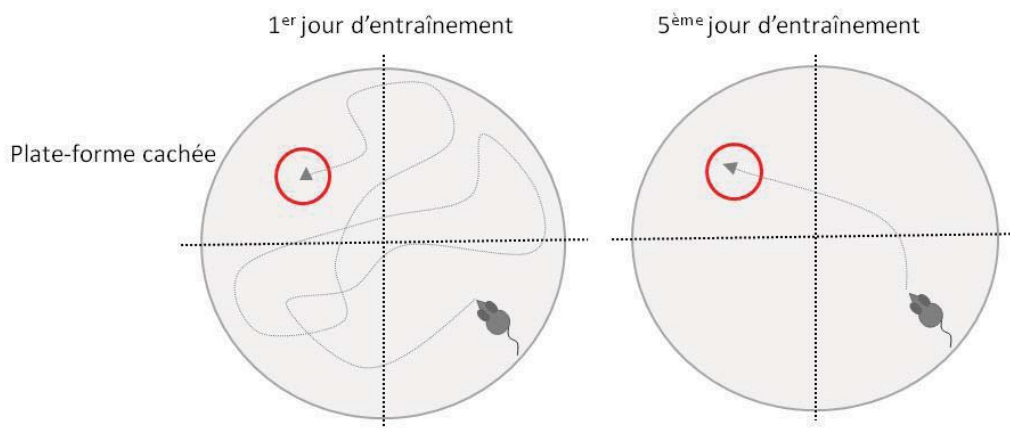


Figure 35 : Schématisation de l'enregistrement vidéo lors de la phase d'apprentissage d'une souris lors de son premier et dernier jour d'entraînement.

Pour chacun des essais, la souris a été placée dans le bassin, museau face à la paroi. Chaque essai a duré au maximum 120 secondes, passé ce délai, si la souris n'avait pas trouvé la cible, elle était gentiment guidée jusqu'à la plate-forme et y restait pendant 15 secondes. L'animal a été ensuite replacé dans sa cage pendant 15 minutes avant le début d'un nouvel essai (**Figure 36**).

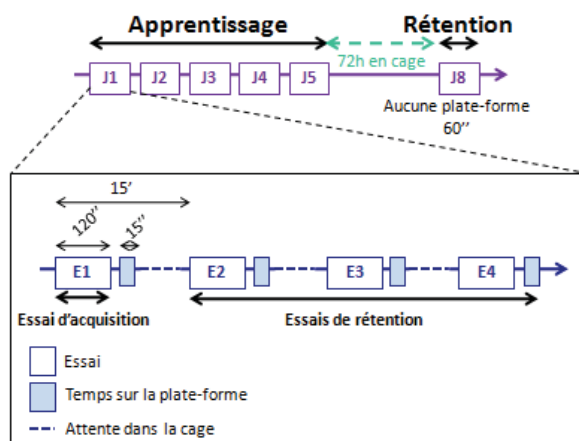


Figure 36 : Schématisation du protocole expérimental utilisé pour les phases d'apprentissage spatial et de rétention du test de la piscine de Morris.

Les points de lâcher ainsi que l'ordre de passage des animaux ont été pseudo-randomisés afin de ne pas induire de biais expérimentaux au moment de l'analyse des résultats.

La vidéo du lien suivant <http://www.youtube.com/watch?v=LrCzS1bvSN4> présente une souris sauvage lors de son premier et de son dernier essai de la phase d'apprentissage spatial.

2.5.2.3. Phase de rétention

Afin de vérifier la mise en place d'une mémorisation à long terme efficace de la position de la plate-forme, un test des cadrans a été réalisé 72 heures après le dernier jour d'acquisition. Dans cet essai, la plate-forme a été retirée du bassin et chaque souris a été lâchée dans la piscine pendant 120 secondes et son activité exploratoire quantifiée (**Figure 37**).

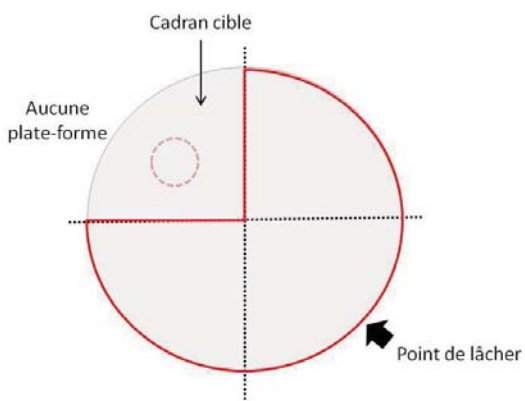


Figure 37 : Configuration du test des cadrans.

2.6. Sacrifice des souris et prélèvements des tissus

Les souris THY-Tau22 et littermates, injectées à l'âge de 3,5 mois, ont été sacrifiées à l'âge de 9 mois par dislocation cervicale. Elles avaient toutes effectué, au préalable, le test de la piscine de Morris.

Pour les analyses immuno-histochimiques, l'hémisphère gauche de l'encéphale a été prélevé et placé dans du PBS pendant quelques minutes puis post-fixé dans du PFA pendant une semaine. Les hémisphères ont

été transférés dans une solution cryo-protectrice contenant du sucrose 6 % puis 30 %, pendant une journée. Enfin, ils ont été congelés dans de l'isopentane à -35°C puis conservés à -80°C.

Pour les analyses biochimiques et de biologie moléculaire, l'hémisphère droit a été disséqué dans le but de prélever l'hippocampe et le cortex. Les différentes pièces anatomiques ont ensuite été congelées dans de l'azote liquide (-196°C) puis conservées à -80°C.

2.7. Analyses immunohistochimiques

2.7.1. Coupe des hémisphères au cryostat

Réglages du cryostat : température d'objet : -15°C ; température de chambre : -19°C ; épaisseur de coupes : 40 µm.

Les hémisphères ont été placés dans la matrice Tissuteck (CellPath). L'objet a ensuite été positionné parallèlement à la lame. Les coupes sagittales ont été placées successivement dans des puits contenant du tampon PBS + 0,2 % d'azide à 4°C. Pour une conservation à long terme, elles ont été placées dans du glycérol, de l'éthylène glycol et du PBS à -20°C.

2.7.2. Immunohistochimie par immunoperoxydase

Les coupes flottantes ont d'abord été rincées avec une solution de PBS + 0,2 % de Triton. Cette technique mettant en jeu une révélation chromogène basée sur l'activité enzymatique de la peroxydase, les peroxydases endogènes ont été désactivées par un traitement de 30 minutes à l'eau oxygénée (H₂O₂ à 0,3%). Un nouveau rinçage au PBS + 0,2 % de Triton a été réalisé.

La deuxième étape consiste à bloquer les sites aspécifiques de fixation de l'anticorps primaire. Pour cela, les coupes ont été incubées dans du « Mouse IgG blocking reagent » (Vector Laboratories). Après trois rinçages, les coupes ont été mises au contact de l'anticorps primaire une nuit à 4°C (AT100 et HA).

Les coupes flottantes ont été rincées trois fois avant d'être mises en présence de l'anticorps secondaire pendant une heure à température ambiante. Les anticorps monoclonaux étant développés chez la souris, l'anticorps secondaire associé est un anti-IgG de souris biotinylé produit chez la chèvre (Vector Laboratories). Des contrôles anticorps secondaires seuls ont également été effectués. Trois rinçages ont de nouveau été nécessaires.

Les coupes ont ensuite été incubées deux heures avec un complexe d'amplification de la révélation chromogène grâce à une association avidine-biotine-peroxydase (ABC Kit Elite, Vector Laboratories). Une solution de révélation a été préparée : 50 % DAB (3,3'diaminobenzidine, Sigma-Aldrich), 50 % Tris 0,2 M pH 7,6 et 0,045 % H₂O₂. Après un rinçage, les coupes ont été mises au contact de la DAB qui s'oxyde en présence de la peroxydase en produisant un précipité marron. Lorsque le signal a été jugé optimal, la réaction a été interrompue par un rinçage à l'eau milli-Q. Les coupes flottantes ont été transférées dans du sérum physiologique, puis montées sur des lames gélatinées.

Une fois sèches, les lames ont été déshydratées par des bains d'alcool de 5 minutes (éthanol 30 %, éthanol 70 %, éthanol 95 % et enfin éthanol 100 %), puis par trois bains de toluène, afin de pouvoir appliquer les lamelles à l'aide d'un baume synthétique (VectaMount™ Permanent, laboratoires Vector).

2.8.Extraction d'ARN et RT-qPCR

2.8.1. Extraction d'ARN

Les ARN hippocampiques ont été extraits à l'aide du kit RNABle® (Eurobio). Les culots, récupérés en fin d'extraction, ont été repris dans un volume d'eau stérile puis congelés à -80°C.

La pureté des ARN a été vérifiée par dépôt sur gel d'agarose, après migration à 90 V pendant 20 à 25 min et révélation par le BET.

2.8.2. RT-qPCR

2.8.2.1. Transcription inverse

La transcription inverse (RT) permet la transcription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Pour la réaliser, le mélange réactionnel suivant a été effectué, pour un puits :

		Volume
Tampon 5 X	SuperScript™ II Reverse Transcriptase d'Invitrogen™	4 µl
DTT (dithiothreitol)	SuperScript™ II Reverse Transcriptase d'Invitrogen™, 100 mM	2 µl
Mélange de dNTP	Amersham Megaprime™ DNA Labeling System	1 µl
Random Hexamères 4 X	Thermo Scientific®, 400 ng/µl	1,5 µl
Reverse Transcriptase	SuperScript™ II Reverse Transcriptase d'Invitrogen™, 200 unités/µl	0,5 µl
RNasin	RNasin® Ribonuclease Inhibitors de Promega™, 20 à 40 unités/µl	0,5 µl
Eau stérile		0,5 µl

10 µl de ce mélange ont été déposés par puits puis 1 µg d'ARN (10 µl à 100 ng/µl). Le programme de RT s'est déroulé dans un thermocycleur de type GeneAmp PCR system 9700® (Perkin-Elmer AppliedBiosystems), en 3 étapes : 10 min à 20°C, 30 min à 42°C, et 5 min à 99°C.

2.8.2.2. PCR quantitative

Les conditions de PCR quantitative utilisées sont les suivantes :

- Activation de la Taq polymérase pendant 10 min à 95°C,
- 50 cycles :
 - o Dénaturation de 15 s à 95°C,
 - o Hybridation des amorces suivie d'une élongation de 1 min à 65°C.

Le gène TBP (TATA box binding protein), gène de référence, a permis la normalisation des données brutes ainsi obtenues. Sa quantification permet de prendre en compte la quantité et la qualité des ARN totaux et l'efficacité de l'étape de transcription inverse.

Il a été utilisé pour deux dilutions afin de vérifier l'absence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADNc. Les différents échantillons contenant l'ADNc ont été dilués au 1/40^{ème} dans de l'eau stérile. 5 µl d'échantillon dilué a été déposé par puits sur une plaque 384 puits. Chaque échantillon a été testé en duplicate.

Le mélange suivant a été réalisé pour chaque couple d'amorces :

- 4,8 µl de *Power SYBR® Green* (PCR Master Mix d'Applied Biosystems™),
- 0,1 µl d'amorce sens de concentration initiale égale à 50 pmol/µl,
- 0,1 µl d'amorce anti-sens de concentration initiale égale à 50 pmol/µl.

Pour chaque puits concerné, 5 µl du mélange ont été ajoutés.

La plaque 384 puits filmée a été centrifugée une minute à 1000 tours/min, puis a été placée dans l'appareil à PCR quantitative (ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System).

2.8.2.3. Analyse des résultats

Le logiciel ABI SDS software version 2.2 a permis l'enregistrement des données de fluorescence et la détermination des cycles seuil (Ct). La quantité de transcrits d'un gène cible est déduite du Ct qui correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significatif.

Les résultats, appelés Ncible, représentent le niveau de transcrits du gène cible rapporté à celui du gène de référence, selon la formule : $N_{cible} = 2^{\Delta Ct \text{ échantillon}}$ où la valeur du ΔCt de l'échantillon est obtenue en soustrayant la valeur du Ct du gène cible à la valeur du Ct du gène de référence TBP.

Pour chaque gène, le taux de transcrits de chaque échantillon, est normalisé par rapport à la limite de détection c'est-à-dire un Ct de 35 égal à 1.

2.8.2.4. Conception des amorces

Les amorces ont été dessinées à partir des informations génomiques référencées sur NCBI et MultAlin (Multiple sequence alignment par Florence Corpet) et du logiciel OLIGO® version 4.

Les séquences des différentes amorces utilisées sont indiquées ci-dessous :

Gènes	Séquence sens	Séquence anti-sens
Tbp Mm	5' CCC TTG TAC CCT TCA CCA ATG AC 3'	5' TCA CGG TAG ATA CAA TAT TTT GAA GCT G 3'
Mapt Mm	5' GGG CAT GTG ACT CAA GCT CGT 3'	5' CCC TTG GCT TTC TTC TCG TCA T 3'
MAPT Hs	5'ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA 3'	5' CTG CTG TAG CCG CTG CGA T 3'
Cyp46a1 Mm	5' GGC TAA GAA GTA TGG TCC TGT TGT AAG A 3'	5' GGT GGA CAT CAG GAA CTT CTT GAC T 3'
CYP46A1 Hs	5' AGA AGT ATG GAC CTG TTG TGC GG 3'	5' TGG TTG ACA TCA GGA ACT TCT TAA CC 3'

Les différents couples d'amorces ont été testés sur des échantillons contrôles afin de vérifier leur efficacité et leur spécificité. Différentes transcriptions inverses ont été réalisées sur des mélanges d'ARN de tissus humains et de tissus murins :

- Une RT⁺ (*contrôle positif*) : Une RT normale avec présence de la reverse transcriptase,
- Une RT⁻ (*contrôle négatif*) : Une RT dans laquelle la reverse transcriptase n'est pas présente, l'ARN n'est donc pas rétro-transcrit en ADNc,
- Une RT^{+/-} (*contrôle ADN*) : Une RT⁻ à laquelle de l'ADN contaminant est ajouté, permettant ainsi de vérifier l'absence d'hybridation des amorces sur l'ADN.

De plus, lors de ces tests, une étape de courbe de dissociation a été ajoutée lors de la PCR quantitative. Ceci a permis de visualiser la température de fusion de l'amplicon et de détecter la présence ou non de dimères d'amorces ou d'amplification non spécifique.

2.9. Analyses protéiques

Les échantillons d'hippocampe ont été mis dans du tampon (Tris 50 mM, Sucrose 0,32 M, inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific®) et de phosphatases (Roche)) puis soniqués 25 coups de 0,5 s à 40 % d'amplitude. Ils ont été agités sur roue 30 min à 4°C.

Par la suite, ils ont été dosés à l'aide du kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific®).

Les protéines ont été ensuite séparées par une électrophorèse (60 min à 200 V, cuve Invitrogen™) selon leur poids moléculaire sur des gels 4-12 % SDS-PAGE (NuPAGE®, Bis-Tris Novex® protein analysis solutions) dans du tampon MOPS (NuPAGE® Invitrogen™). Puis, elles ont été transférées (90 min à 30 V) sur des membranes de nitrocellulose (Hybond, GE Amersham). La qualité du transfert a été contrôlée par une coloration au rouge Ponceau (0,2 % de rouge, 3 % d'acide trichloracétique dans de l'eau distillée). Après blocage 30 min dans le tampon de blocage (identique à celui de saturation), les membranes ont été incubées avec l'anticorps (Ac) primaire pendant la nuit à 4°C (cf. tableau ci-dessous).

Nom de l'Ac	Epitopes reconnus	Tampon de saturation	Dilution de l'Ac	Espèce d'origine
AT100	T/S212 et S214	TNT	1/1000	Souris
pS422	S422	TNT avec 5 % de lait	1/2000	Lapin
Tau Cter	15 derniers acides aminés	TNT avec 5 % de lait	1/10000	Lapin
GAPDH		TNT avec 5 % de lait	1/10000	Lapin

Les membranes ont ensuite été rincées au TNT (15 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 0,3 M NaCl ; 0,1% Tween 20 X) avant d'être incubées une heure avec un Ac secondaire spécifique de l'espèce de l'Ac primaire (souris, dilution 1/50000 ; lapin, dilution 1/5000 ; Vector Laboratories) couplé à la peroxydase pendant 45 min à température ambiante. Les membranes ont été de nouveau lavées avec du TNT avant la révélation du complexe protéine/anticorps à l'aide du kit SuperSignal® West Pico de Thermo Scientific® et de l'appareil LAS-3000 (FUJIFILM).

L'analyse semi-quantitative de l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. La GAPDH, faisant office de contrôle des dépôts, a permis de normaliser les valeurs obtenues. Plusieurs quantifications ont été réalisées :

- Le taux d'hyperphosphorylation de Tau grâce à Tau Cter,
- La proportion de phosphorylation pathologique de Tau grâce à AT100 et PS422.

Les résultats ont été représentés sous forme d'histogrammes dans lesquels les valeurs obtenues pour les souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP muté ont été rapportées à une base de 100 %.

2.10. Présentation des résultats

Pour le test de la piscine de Morris, les données ont été analysées par analyse de variance (ANOVA) à une voie avec ou sans mesure répétée (le temps), suivie par un test de Fischer lorsque celui-ci était justifié.

Pour toutes les analyses statistiques, le seuil de significativité a été établi pour une p value < 0,05. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Statistica version 7.0 (StatSoft®, Inc., Tulsa, USA) ou GraphPad Prism® 5 (La Jolla, USA).

3. Résultats

3.1. Génotype des souris

Le génotypage des souris par prélèvement de queue et PCR sur ADN a tout d'abord permis d'identifier sans ambiguïté les souris THY-Tau22 par rapport aux souris littermates. Les souris THY-Tau22 sont hétérozygotes pour le transgène Tau et présente donc une bande entre 500 et 600 paires de base (pb). Les souris littermates ne possèdent pas le transgène, aucune bande n'est donc visible dans leur cas (**Figure 38**).

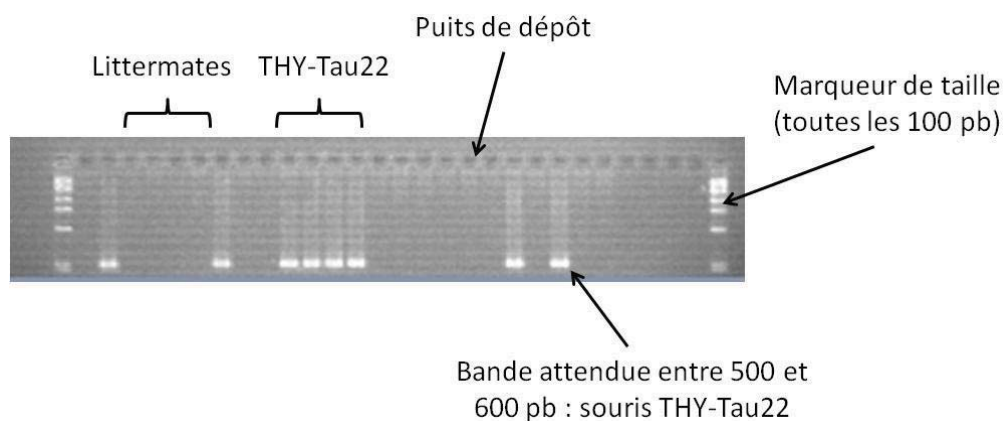


Figure 38 : Génotypage de souris THY-Tau22 et littermates. Les marqueurs de taille sont dans les puits aux extrémités et séparés des échantillons par un puits vide. 8 souris THY-Tau22 et 18 souris littermates ont été génotypées sur ce gel.

3.2. La surexpression de CYP46A1 normalise les performances cognitives des souris THY-Tau22 dans le test de la piscine de Morris

Afin d'évaluer le potentiel de la surexpression de CYP46A1 à restaurer le phénotype mnésique principal de la souris THY-Tau22, la mémoire de référence spatiale des souris THY-Tau22 et littermates injectées avec le vecteur AAV-CYP WT ou AAV-CYP muté a été évaluée par le test de la piscine de Morris à l'âge de 9 mois. Dans ce test, les souris, immergées dans un bassin circulaire, doivent générer une carte mentale de leur environnement afin de trouver une plate-forme à position fixe, seul point de sortie du bassin.

L'analyse a porté sur 25 souris THY-Tau22 (injectées avec le vecteur AAV-CYP muté, n = 11 ; injectées avec le vecteur AAV-CYP WT, n = 14) et 13 souris littermates (injectées avec le vecteur AAV-CYP muté, n = 7 ; injectées avec le vecteur AAV-CYP WT, n = 6).

- Littermates CYP muté
- Littermates CYP WT
- ▲--- THY-Tau22 CYP muté
- ▼--- THY-Tau22 CYP WT

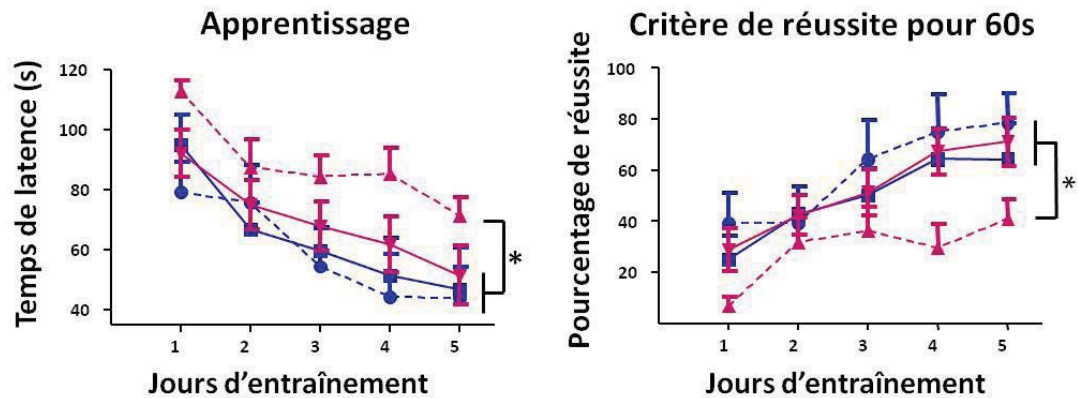


Figure 39 : Graphiques présentant l'apprentissage et le critère de réussite pour 60 secondes des souris littermates et THY-Tau22 en fonction du jour d'entraînement.

L'analyse ANOVA (facteurs principaux : Groupe et Jour) réalisée sur le temps de latence nécessaire à trouver la plate-forme ainsi que sur le pourcentage de souris trouvant la plate-forme en moins de 60 secondes (critère de réussite permettant d'évaluer le niveau d'apprentissage) a permis de mettre en évidence un effet significatif du facteur Groupe ($F_{3,34} = 4,18$; $ps < 0,02$) ainsi que du facteur Jour ($F_{4,136} = 10,44$; $ps < 0,001$). La présence d'une interaction entre ces principaux facteurs n'a pu être démontrée ($F_{12,136} < 1$) (**Figure 39**). L'effet du facteur Groupe est mis en évidence par une diminution variable du temps de latence pour trouver la plate-forme en fonction du groupe expérimental. De plus, le temps de latence diminue avec le temps pour toutes les souris (effet du facteur Jour). La présence d'un effet significatif du facteur Groupe, en l'absence d'interaction avec le facteur Jour, nous autorise à faire une analyse post hoc courbe contre courbe indépendamment du temps.

Les performances des souris littermates traitées avec le vecteur AAV-CYP WT ou AAV-CYP muté ont été identiques pour les deux mesures d'apprentissage ($F_{1,34} < 1$). Les souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur contrôle CYP muté ont présenté un temps de latence accru par rapport aux souris littermates ($F_{1,34} = 6,00$; $ps < 0,02$) ainsi qu'un pourcentage de réussite au critère drastiquement réduit ($F_{1,34} = 4,83$; $ps < 0,04$) par rapport aux souris littermates. Les souris THY-Tau22 traitées avec le vecteur AAV-CYP WT ont présenté des performances d'apprentissage équivalentes aux souris « normales » littermates ($F_{1,34} < 1$) avec des performances largement supérieures à celles observées chez leurs congénères traitées avec CYP muté ($F_{1,34} = 9,92$; $p < 0,004$) (**Figure 39**).

L'analyse ANOVA réalisée sur le pourcentage de temps passé dans le cadran cible a montré un effet significatif du facteur Groupe ($F_{3,34} = 3,48$; $p < 0,03$). Une nouvelle fois, les souris THY-Tau22 traitées avec le vecteur AAV-CYP muté ont présenté un pourcentage de temps passé dans le cadran cible nettement réduit par rapport aux trois autres groupes expérimentaux ($F_{1,34} = 9,54$; $p < 0,004$), qui présentaient quant à eux des performances similaires ($F_{1,34} < 1$) (**Figure 40**).

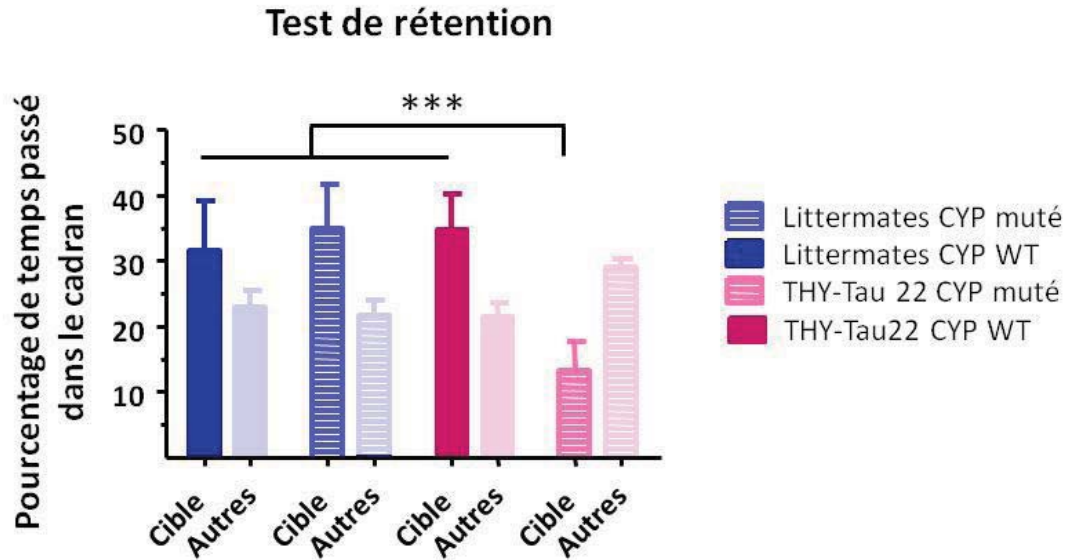


Figure 40 : Résultats du test de rétention effectué par les souris littermates et THY-Tau22.

De manière importante, le pourcentage de temps passé dans le cadran cible des souris THY-Tau22 traitées avec le vecteur AAV-CYP WT était identique au pourcentage de temps passé dans le cadran cible des souris littermates traitées par le vecteur AAV-CYP WT ou muté.

3.3. Expression des transgènes Tau et CYP46A1 chez les souris injectées

La pureté des ARN a été vérifiée par dépôt sur gel d'agarose et révélation par le BET. Lorsque les échantillons d'ARN étaient de bonne qualité, le gel a permis de révéler les 3 bandes d'ARN ribosomal (5, 18 et 28 S) (**Figure 41**).

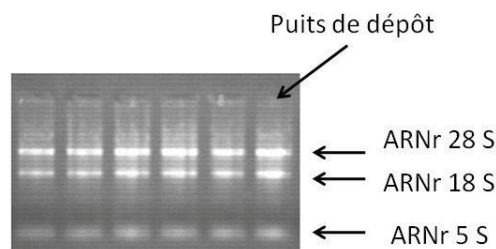


Figure 41 : Profil de migration d'échantillons d'ARN.

L'expression du transgène humain Tau (*MAPT*) et du transgène humain *CYP46A1* a été également étudiée par RT-PCR quantitative dans les hippocampes des souris THY-Tau22 injectées avec les vecteurs AAV-CYP WT et AAV-CYP muté. Une expression identique du transgène humain Tau (*MAPT*) a été retrouvée chez l'ensemble des souris THY-Tau22 traitées avec les vecteurs AAV-CYP (WT ou muté) alors qu'elle était absente chez des souris littermates non injectées, comme attendu (**Tableau 8**). L'expression du transgène humain *CYP46A1* muté a été retrouvée environ 3 fois supérieure à l'expression du transgène humain *CYP46A1* WT chez les souris THY-Tau22 injectées avec les vecteurs AAV-CYP muté ou AAV-CYP WT (**Tableau 8**).

Aucune modification de l'expression des gènes endogènes Tau et *Cyp46a1* murins n'a été mise en évidence chez les souris THY-Tau22 injectées par rapport à l'expression des mêmes gènes chez les souris littermates non injectées (**Tableau 8**).

Gènes étudiés		<i>MAPT</i> humain	<i>Mapt</i> murin	<i>CYP46A1</i> humain	<i>Cyp46a1</i> murin
Moyenne ± SEM	THY-Tau22 CYP WT (n = 11)	254 804 ± 21 229	50 425 ± 1 663	64 268 ± 15 972	32 592 ± 1 816
	THY-Tau22 CYP muté (n = 4)	242 959 ± 8 713	51 131 ± 2 920	182 866 ± 60 102	29 351 ± 4 225
	Littermates non injectées (n = 6)	0	45 014 ± 4 950	0	28 459 ± 2 531

Tableau 8 : Expression des gènes Tau et CYP humains et murins chez des souris littermates non injectées et chez les souris THY-Tau22. Les valeurs indiquées sont des unités arbitraires d'expression normalisées par rapport à l'expression du gène de référence TBP.

Remarque : En nomenclature officielle, les gènes humains sont représentés en majuscules contrairement aux gènes murins qui sont représentés en minuscules la plupart du temps, et en italiques.

3.4. La surexpression de CYP46A1 diminue l'hyperphosphorylation de Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22

3.4.1. Expression du transgène CYP46A1-HA dans l'ensemble de l'hippocampe

L'expression de CYP WT et muté a été étudiée avec un anticorps anti-HA par immunohistochimie (IHC) dans l'hippocampe des souris traitées. L'expression de CYP WT et CYP muté a été retrouvée identique chez toutes les souris THY-Tau22 injectées, avec une expression de CYP46A1 relativement uniforme dans les régions CA1, 2 et 3 et dans le gyrus denté et plus prononcée dans le hile de l'hippocampe (**Figure 42**, **Figure 43**, **Figure 44**).

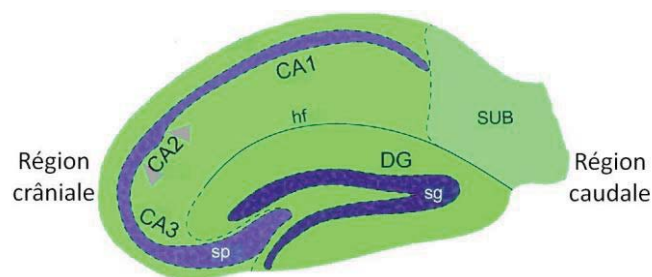


Figure 42 : Schématisation d'une coupe sagittale d'hippocampe murin tirée de l'atlas Allen. CA : Corne d'Ammon ; DG : Gyrus Denté ; SUB : SUBiculum ; hf : fissure hippocampique ; sp : couche pyramidale ; sg : couche granulaire.

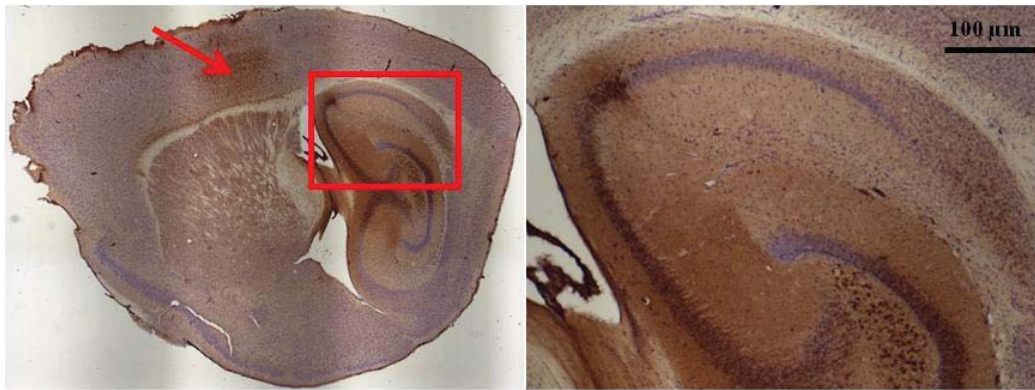


Figure 43 : Expression représentative de CYP46A1 muté dans l'hippocampe d'une souris THY-Tau22 injectée avec le vecteur AAV-CYP muté (révélation de l'expression à la DAB (coloration brune) et contre coloration au crésyl violet). On voit également sur cette coupe l'expression de CYP46A1 muté dans le cortex cérébral de la souris injectée (flèche).



Figure 44 : Expression représentative de CYP46A1WT dans l'hippocampe d'une souris THY-Tau22 injectée avec le vecteur AAV-CYP WT (révélation de l'expression à la DAB et contre coloration au crésyl violet). On voit également sur cette coupe l'expression de CYP46A1 WT dans le cortex cérébral de la souris injectée (flèche).

L'ensemble de ces résultats indiquent une expression identique de CYP WT et de CYP muté chez les souris THY-Tau22 injectées avec les vecteurs AAV-CYP WT ou AAV-CYP muté.

3.4.2. Etude de la phosphorylation de Tau dans l'hippocampe

L'anticorps AT100 permet de détecter en immunohistochimie la phosphorylation anormale de Tau. Par ailleurs, le transgène Tau humain est majoritairement exprimé dans la région CA1 de l'hippocampe chez la souris THY-Tau22.

La **Figure 45** montre que l'intensité du marquage AT100 est moins importante chez les souris THY-Tau22 exprimant CYP WT que chez les souris THY-Tau22 exprimant CYP muté suggérant une diminution de la phosphorylation anormale de Tau chez les souris THY-Tau22 exprimant CYP WT.

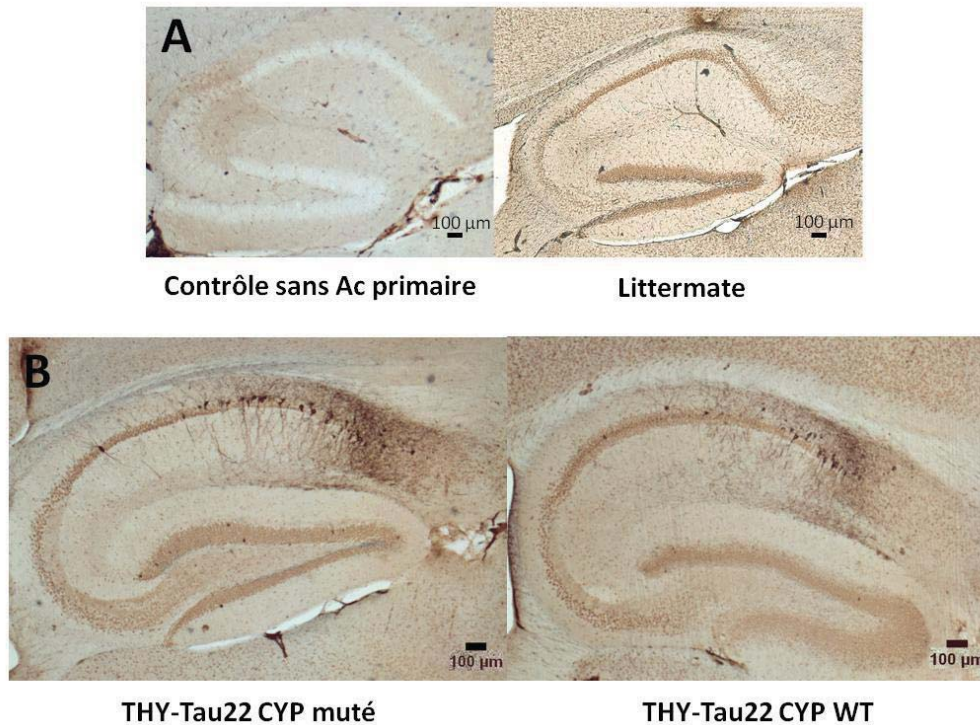


Figure 45 : Marquage AT100 permettant de visualiser la phosphorylation anormale de Tau en coupe sagittale au niveau de l'hippocampe dans le modèle murin THY-Tau22 (B) et chez deux contrôles négatifs (A), l'un étant une souris littermate et l'autre une coupe de souris THY-Tau22 n'ayant pas été incubée avec l'anticorps primaire.

3.5. Analyse biochimique de l'hyperphosphorylation de Tau dans l'hippocampe des souris THY-Tau22

L'effet de la surexpression de CYP46A1 sur la phosphorylation de Tau a également été étudié par Western blot. Les anticorps Tau Cter (reconnaissant la totalité des protéines Tau), AT100 et pS422 (reconnaissant la phosphorylation anormale de la protéine Tau respectivement sur les épitopes [S/T212 et S214] et [S422]) ont été utilisés à cet effet (**Figure 46 A**).

La **Figure 46 B** présente les résultats obtenus pour deux hippocampes de souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP muté et cinq hippocampes de souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP WT. La GAPDH a été utilisée comme protéine témoin de charge.

L'anticorps Tau Cter reconnaît l'ensemble de la protéine Tau phosphorylée. Après révélation en Western blot, cette protéine apparaît sous deux formes : la bande du haut correspondant à la protéine Tau hyperphosphorylée et la bande du bas à la phosphorylation « standard » de Tau (**Figure 46**).

Les anticorps AT100 et PS422 permettent de reconnaître la phosphorylation anormale de Tau. Pour ces anticorps, la protéine est visualisable sur une bande (**Figure 46**).

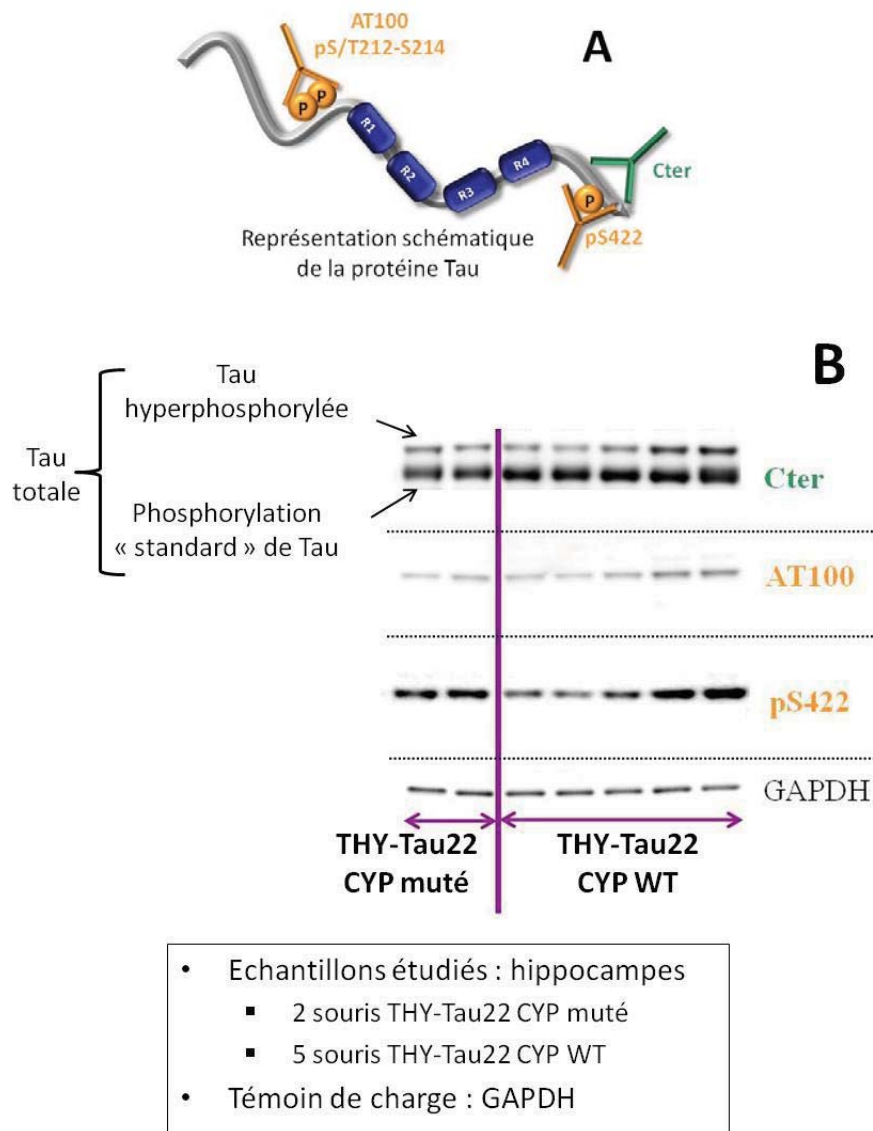


Figure 46 : A : Représentation schématique, sur la protéine Tau, de la localisation des différents anticorps primaires. B : Western blots réalisés avec les anticorps Cter, AT100 et pS422 sur les hippocampes des souris THY-Tau22 traitées avec le vecteur CYP WT (n=5) et le vecteur AAV-CYP muté (n=2).

Les quantifications ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe 2.9. La quantité de Tau hyperphosphorylée a été évaluée en rapportant l'intensité de la bande du haut sur l'ensemble des deux bandes observées avec l'anticorps Tau Cter. La proportion de Tau anormalement phosphorylée sur la sérine/thréonine 212 et la sérine 214 (AT100) et sur la sérine 422 (PS422) a été déterminée de la même façon (**Figure 47**).

Aucune modification de la quantité de protéine Tau n'est observée entre les deux groupes de souris Tau (**Figure 47**). Ce résultat indique que l'injection du vecteur AAV-CYP WT fonctionnel ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de la protéine Tau humaine chez les souris THY-Tau22.

Chez les souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP WT, l'hyperphosphorylation globale de Tau et la phosphorylation des deux épitopes pathologiques sont diminués d'environ 20 % par rapport aux souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP muté (**Figure 47**). Les calculs statistiques n'ont pu être effectués

en raison du nombre trop faible d'échantillons étudiés (seulement deux souris THY-Tau22 injectées avec le vecteur AAV-CYP muté).

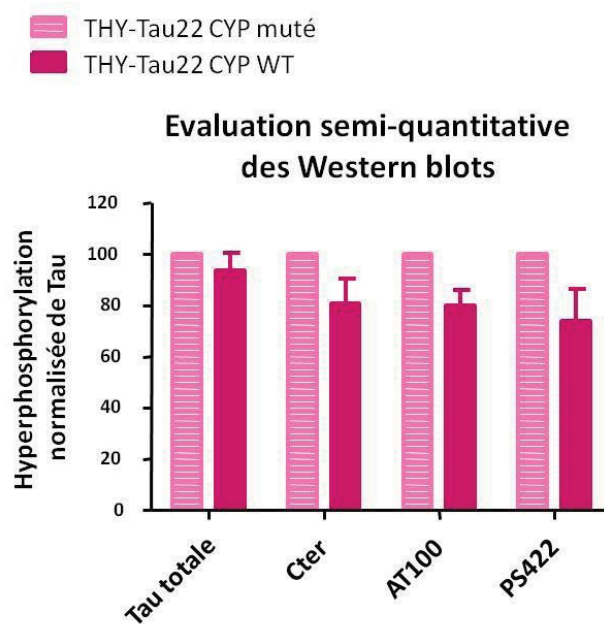


Figure 47 : Histogrammes représentant la quantité de protéine Tau totale ainsi que l'hyperphosphorylation de Tau pour les épitopes Cter, AT100 et PS422 chez les souris THY-Tau22 traitées avec les vecteurs AAV-CYP WT et AAV- CYP muté.

4. Discussion

CYP46A1 code pour une cholestérol-24-hydroxylase, enzyme clé du métabolisme du cholestérol cérébral (Vaya and Schipper 2007; Leoni and Caccia 2011). L'objectif de mon travail a été de tester si, comme cela a pu être montré sur la pathologie amyloïde de la souris APP23 (Hudry, Van Dam et al. 2010), la surexpression de CYP46A1 a un effet protecteur sur la pathologie Tau dans le modèle de souris transgénique THY-Tau22. Cette question est importante dans la démarche d'évaluation de CYP46A1 comme cible thérapeutique potentiellement pertinente pour la maladie d'Alzheimer puisque les deux principales anomalies pathologiques observées sont la présence de plaques amyloïdes dues à un métabolisme anormal de l'APP, mais aussi de DNFs dues à une phosphorylation anormale de la protéine Tau.

En effet, le tissu cérébral de patients atteints de la MA présente une diminution du nombre de neurones exprimant la cholestérol 24-hydroxylase, en lien probablement avec la dégénérescence neuronale (Brown, Theisler et al. 2004). La concentration en 24S-hydroxycholestérol est abaissée dans le liquide céphalorachidien et dans le sang périphérique chez des patients atteints de la MA à un âge avancé de la maladie (Papassotiropoulos, Lutjohann et al. 2002), alors qu'elle est augmentée à un âge précoce (Kolsch, Lutjohann et al. 2003).

Les résultats que j'ai obtenus sont une première étape de cette preuve de concept. En effet, ils suggèrent que la surexpression de CYP46A1 dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 diminue l'hyperphosphorylation globale et la phosphorylation anormale de Tau dans cette structure cérébrale et que la

surexpression de CYP46A1 est associée à une amélioration des fonctions mnésiques des souris THY-Tau22 traitées.

Dans ce travail, les souris THY-Tau22 ont été traitées à un stade précoce (3,5 mois) de leur pathologie Tau et les effets de l'injection de vecteurs AAV codant pour *CYP46A1* ont été évalués 6 mois plus tard, au pic de la pathologie Tau dans ce modèle.

Les souris THY-Tau22 ont été injectées avec un vecteur AAV codant pour une enzyme CYP46A1 fonctionnelle et mutée dans l'hippocampe et le cortex. Dans l'analyse de ces expériences, je me suis d'abord attachée à corrélérer les modifications des fonctions mnésiques des souris THY-Tau22 traitées avec l'expression de CYP46A1 dans l'hippocampe et les modifications de la phosphorylation de Tau dans cette même structure cérébrale. L'analyse de l'expression de l'enzyme CYP46A1 fonctionnelle et mutée dans le cortex et les effets de cette surexpression sur la phosphorylation de Tau dans le cortex cérébral font l'objet d'une analyse en cours.

A 9 mois, les performances mnésiques des souris THY-Tau22 non traitées sont significativement diminuées par rapport à celles de souris contrôles littermates aussi bien lors de la phase d'apprentissage que lors de la phase de rétention du test de la piscine de Morris confirmant les données publiées sur ce modèle (Schindowski, Bretteville et al. 2006). Ces performances mnésiques sont améliorées chez les souris THY-Tau22 traitées avec le vecteur AAV codant pour l'enzyme CYP46A1 fonctionnelle. En effet, ces dernières démontrent un niveau de performance normal par rapport à des souris contrôles littermates injectées avec le vecteur AAV-CYP WT ou AAV-CYP muté. Cet effet bénéfique a été observé sur la mémoire à long terme, la phase de rétention ayant été réalisée 72 heures après le dernier jour de la phase d'apprentissage. La surexpression de CYP46A1 permet donc un sauvetage phénotypique total du déficit mnésique principal de la souris THY-Tau22. Ce sauvetage a été observé alors que la pathologie Tau est à son pic dans ce modèle. Les souris littermates traitées avec le vecteur AAV-CYP WT ou AAV-CYP muté ont présenté des performances mnésiques équivalentes au cours des différentes phases du test permettant d'affirmer que l'injection de vecteur AAV-*CYP46A1* n'a aucun effet promnésiant. En effet, les souris THY-Tau22 traitées avec un vecteur AAV faisant exprimer une enzyme CYP46A1 non fonctionnelle n'ont montré aucune amélioration de leurs fonctions mnésiques.

Le profil d'expression de la protéine CYP46A1 évaluée avec un anticorps anti-HA est identique chez les souris THY-Tau22 injectées avec un vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle ou non fonctionnelle, avec une expression retrouvée dans les régions CA1, CA2, CA3, le gyrus denté et principalement le hile de l'hippocampe. L'expression endogène des gènes murins Tau et *Cyp46a1* n'a pas été modifiée par l'injection de vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle ou non fonctionnelle. L'expression du transgène humain Tau présentant les mutations G272V et P301S n'a pas non plus été modifiée par l'injection de vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle ou non fonctionnelle. Enfin, l'expression du gène humain *CYP46A1* muté résultant de l'injection de vecteur AAV est environ 3 fois supérieure à l'expression du gène humain *CYP46A1* WT résultant de l'injection de vecteur AAV chez les souris THY-Tau22 traitées. Ceci n'a pas été observé visuellement en IHC et peut s'expliquer par différentes hypothèses : un mauvais titrage d'un des deux vecteurs, une mauvaise conservation du vecteur AAV-CYP WT ou encore une erreur de dilution.

L'ensemble de ces résultats ainsi que l'absence d'amélioration des fonctions mnésiques des souris THY-Tau22 injectées avec un vecteur encodant une enzyme CYP46A1 non fonctionnelle suggère fortement que l'amélioration des fonctions mnésiques des souris THY-Tau22 injectées avec un vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle est bien due à l'expression de cette enzyme dans l'hippocampe. On ne peut cependant écarter la possibilité que l'expression d'une enzyme CYP46A1 fonctionnelle dans le cortex ait pu aussi contribuer à l'amélioration des fonctions mnésiques des souris THY-Tau22 traitées.

L'étude immunohistochimique de la phosphorylation anormale de Tau dans l'hippocampe avec l'anticorps AT100 semble montrer une intensité de marquage diminuée chez les souris THY-Tau22 traitées avec un vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle par rapport aux souris traitées avec un vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 non fonctionnelle. La quantification est en cours.

L'effet bénéfique de la surexpression de l'enzyme CYP46A1 fonctionnelle sur la l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de Tau a pu être confirmé par une étude en Western blot avec des anticorps spécifiques. En particulier, les résultats obtenus avec les anticorps AT100 (pT/S212 et pS214) et pS422 ont permis de montrer une diminution d'environ 20 % de la phosphorylation anormale de Tau chez les souris THY-Tau22 traitées avec un vecteur AAV encodant une enzyme CYP46A1 fonctionnelle.

L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression de CYP46A1 a un effet bénéfique sur l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de Tau chez la souris THY-Tau22 et que la surexpression de CYP46A1 en corrige le principal déficit mnésique.

Différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cet effet protecteur possible de la modulation du métabolisme du cholestérol vis-à-vis de la pathologie Tau :

Fyn est une protéine membranaire qui induit une excitotoxicité lorsqu'elle est délocalisée, sous l'action de Tau, dans la région somato-dendritique. Ce déplacement pourrait être modulé par la délocalisation de Fyn et de Tau dans les radeaux lipidiques (Ittner, Ke et al. 2010). La concentration du cholestérol est élevée dans les radeaux lipidiques ; un excès pourrait induire cette délocalisation et donc cette excitotoxicité. A l'inverse, la surexpression de CYP46A1 en diminuant le contenu en cholestérol des radeaux (Hudry, Van Dam et al. 2010) pourrait réduire cette délocalisation et l'excitotoxicité liée.

Par ailleurs, un excès de cholestérol entraîne une diminution de l'activité de l'AMP kinase (Lu, Wu et al. 2010). Or, elle permet l'inhibition de la phosphorylation de Tau par l'intermédiaire de la GSK-3 β (Salminen, Kaarniranta et al. 2011). Ainsi, la surexpression de CYP46A1 pourrait permettre une diminution du cholestérol intracellulaire dans le modèle THY-Tau22, ce qui pourrait conduire à l'augmentation de l'activité de l'AMPK et donc à l'inhibition de la GSK-3 β contribuant à la diminution de la phosphorylation de Tau.

Il faut noter que l'AMPK régulerait à la fois la GSK-3 β mais également la kinase Fyn (Vatish, Yamada et al. 2009).

Enfin, les protéines NPC1 et NPC2 endosomales et lysosomales lient le cholestérol intracellulaire (NCBI) et permettent sa circulation. Elles sont également impliquées dans le contrôle de la fonction lysosomale (Goldman and Krise 2010). Or, la dégradation des formes pathologiques de Tau est réalisée par la voie

lysosomale (Hamano, Gendron et al. 2008; Wang, Martinez-Vicente et al. 2009). Ceci est cohérent avec les données montrant que l'exercice, en modulant les fonctions de NPC1 et de NPC2, favoriserait la dégradation de ces formes pathologiques de Tau (Belarbi, Burnouf et al. 2011). Un excès de cholestérol pourrait ainsi, en altérant la fonction des protéines NPC1 et NPC2 par un phénomène de saturation, les empêcher de participer correctement à la dégradation des espèces pathologiques de Tau. En augmentant l'excrétion du cholestérol, la surexpression de CYP46A1 pourrait au contraire augmenter l'activité de NPC1 et NPC2 et favoriser une dégradation plus importante de la protéine Tau pathologique.

De nombreuses études complémentaires sont cependant nécessaires chez la souris THY-Tau22 pour confirmer ces premiers résultats encourageants, elles seront réalisées au cours de ma thèse universitaire dans le laboratoire :

- **Etudier les effets de la surexpression intracérébrale de CYP46A1 sur le modèle THY-Tau22 traité à 3,5 mois**
 - Confirmer les résultats préliminaires (sacrifice à 9 mois) :
 - Réaliser des injections pour analyse lipidomique,
 - Poursuivre l'analyse des échantillons des souris déjà sacrifiées.
 - Evaluer l'effet protecteur de CYP46A1 à plus long terme (sacrifice à 12 mois).

Protocole expérimental mis en place pour les souris THY-Tau22 et littermates traitées et non traitées :

- Réalisation de tests comportementaux évaluant la mémoire spatiale avant le sacrifice,
- Etude de la neuropathologie des souris en IHC,
- Etudes biochimiques de la phosphorylation de Tau en électrophorèses 1D et 2D,
- Etudes des modifications lipidiques,
- Etude de biomarqueurs de l'efficacité de la surexpression de CYP46A1.

- **Etudier les effets de la surexpression intracérébrale de CYP46A1 sur le modèle THY-Tau22 traité à 6 mois** (sacrifice à 12 mois, même protocole expérimental)
- **Etudier les mécanismes de l'effet de la surexpression de CYP46A1 sur la pathologie Tau**
 - Matériel d'étude : Lignées cellulaires modèles de tauopathie avec surexpression de CYP46A1 et contrôles sans surexpression,
 - Etude du cholestérol, des radeaux lipidiques et de Fyn, de l'activité de l'AMPK et de la GSK-3 β notamment.

AGREMENT SCIENTIFIQUE



En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **Christelle CAMUS**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Marie-Anne BURLLOT** intitulée « *Evaluation de la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46A1) comme cible thérapeutique dans le modèle de souris THY-Tau22* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

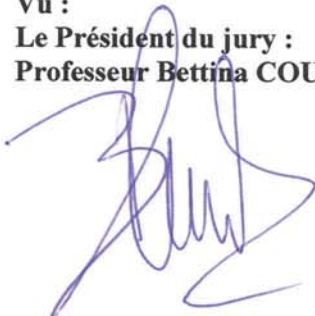
Fait à Toulouse, le 16 Septembre 2011
Docteur Christelle CAMUS
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
**Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse**
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Bettina COUDREC



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier 21 SEP. 2011
Professeur Gilles FOURTANIER



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.
- Ahlijanian, M. K., N. X. Barrezueta, et al. (2000). "Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2910-2915.
- Allen, B., E. Ingram, et al. (2002). "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein." J Neurosci **22**(21): 9340-9351.
- Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, et al. (1996). "Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules." Nat Med **2**(7): 783-787.
- Alonso, A. D., I. Grundke-Iqbal, et al. (1997). "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 298-303.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, et al. (1995). "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." Clin Anat **8**(6): 429-431.
- Andorfer, C., Y. Kress, et al. (2003). "Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms." J Neurochem **86**(3): 582-590.
- Avdulov, N. A., S. V. Chochina, et al. (1997). "Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids." J Neurochem **69**(4): 1746-1752.
- Baba, Y., Y. Tsuboi, et al. (2005). "The effect of tau genotype on clinical features in FTDP-17." Parkinsonism Relat Disord **11**(4): 205-208.
- Ballard, C., S. Gauthier, et al. (2011). "Alzheimer's disease." Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Ballatore, C., V. M. Lee, et al. (2007). "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders." Nat Rev Neurosci **8**(9): 663-672.
- Bartus, R. T. (2000). "On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis." Exp Neurol **163**(2): 495-529.
- Beck, M., V. Bigl, et al. (2003). "Guinea pigs as a nontransgenic model for APP processing in vitro and in vivo." Neurochem Res **28**(3-4): 637-644.
- Begum, A. N., F. Yang, et al. (2008). "Use of copper and insulin-resistance to accelerate cognitive deficits and synaptic protein loss in a rat A β -infusion Alzheimer's disease model." J Alzheimers Dis **15**(4): 625-640.
- Belarbi, K., S. Burnouf, et al. (2011). "Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology." Neurobiol Dis.
- Bensadoun, J. C., S. P. Brooks, et al. (2004). "Free operant and discrete trial performance of mice in the nine-hole box apparatus: validation using amphetamine and scopolamine." Psychopharmacology (Berl) **174**(3): 396-405.

- Bertram, L., M. B. McQueen, et al. (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." Nat Genet **39**(1): 17-23.
- Bertram, L. and R. E. Tanzi (2008). "Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses." Nat Rev Neurosci **9**(10): 768-778.
- Billings, L. M., S. Oddo, et al. (2005). "Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." Neuron **45**(5): 675-688.
- Bons, N., F. Rieger, et al. (2006). "Microcebus murinus: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease?" Genes Brain Behav **5**(2): 120-130.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.
- Brandt, R., J. Leger, et al. (1995). "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain." J Cell Biol **131**(5): 1327-1340.
- Bronner, I. F., B. C. ter Meulen, et al. (2005). "Hereditary Pick's disease with the G272V tau mutation shows predominant three-repeat tau pathology." Brain **128**(Pt 11): 2645-2653.
- Brown, J., 3rd, C. Theisler, et al. (2004). "Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease." J Biol Chem **279**(33): 34674-34681.
- Buccafusco, J. J. (2008). "Estimation of working memory in macaques for studying drugs for the treatment of cognitive disorders." J Alzheimers Dis **15**(4): 709-720.
- Buee, L., T. Bussiere, et al. (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev **33**(1): 95-130.
- Buning, H., L. Perabo, et al. (2008). "Recent developments in adeno-associated virus vector technology." J Gene Med **10**(7): 717-733.
- Burger, C., O. S. Gorbatyuk, et al. (2004). "Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system." Mol Ther **10**(2): 302-317.
- Butterfield, D. A., E. Barone, et al. (2011). "Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: Perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders." Pharmacol Res.
- Capsoni, S., G. Ugolini, et al. (2000). "Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6826-6831.
- Castellani, R. J., R. K. Rolston, et al. (2010). "Alzheimer disease." Dis Mon **56**(9): 484-546.
- Cheng, I. H., J. J. Palop, et al. (2004). "Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation." Nat Med **10**(11): 1190-1192.
- Chin, J. (2011). "Selecting a mouse model of Alzheimer's disease." Methods Mol Biol **670**: 169-189.
- Chishti, M. A., D. S. Yang, et al. (2001). "Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695." J Biol Chem **276**(24): 21562-21570.

- Chourbaji, S., C. Zacher, et al. (2005). "Learned helplessness: validity and reliability of depressive-like states in mice." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 70-78.
- Colton, C. A., D. M. Wilcock, et al. (2008). "The effects of NOS2 gene deletion on mice expressing mutated human AbetaPP." J Alzheimers Dis **15**(4): 571-587.
- Cotman, C. W. and E. Head (2008). "The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches." J Alzheimers Dis **15**(4): 685-707.
- Cutler, R. G., J. Kelly, et al. (2004). "Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2070-2075.
- D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001). "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." Brain Res Brain Res Rev **36**(1): 60-90.
- De Deyn, P. P., I. R. Katz, et al. (2005). "Management of agitation, aggression, and psychosis associated with dementia: a pooled analysis including three randomized, placebo-controlled double-blind trials in nursing home residents treated with risperidone." Clin Neurol Neurosurg **107**(6): 497-508.
- De Deyn, P. P., K. Rabheru, et al. (1999). "A randomized trial of risperidone, placebo, and haloperidol for behavioral symptoms of dementia." Neurology **53**(5): 946-955.
- de Toledo-Morrell, L., F. Morrell, et al. (1984). "Age-dependent deficits in spatial memory are related to impaired hippocampal kindling." Behav Neurosci **98**(5): 902-907.
- Dickey, C. A., M. Yue, et al. (2006). "Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species." J Neurosci **26**(26): 6985-6996.
- Dietschy, J. M. and S. D. Turley (2004). "Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal." J Lipid Res **45**(8): 1375-1397.
- Driscoll, M. and B. Gerstbrein (2003). "Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration." Nat Rev Genet **4**(3): 181-194.
- Duff, K., H. Knight, et al. (2000). "Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes." Neurobiol Dis **7**(2): 87-98.
- Echeverria, V., A. Ducatenzeiler, et al. (2004). "Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex." J Alzheimers Dis **6**(3): 209-219.
- Elfenbein, H. A., R. F. Rosen, et al. (2007). "Cerebral beta-amyloid angiopathy in aged squirrel monkeys." Histol Histopathol **22**(2): 155-167.
- Fassbender, K., M. Simons, et al. (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta - amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5856-5861.
- Flood, D. G., Y. G. Lin, et al. (2009). "A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition." Neurobiol Aging **30**(7): 1078-1090.

- Flotte, T. R., B. C. Trapnell, et al. (2011). "Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-associated Virus Vector Expressing Alpha 1 Antitrypsin: Interim Results." Hum Gene Ther.
- Folkesson, R., K. Malkiewicz, et al. (2007). "A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 777-782.
- Foy, M. R., M. Baudry, et al. (2008). "Estrogen and hippocampal plasticity in rodent models." J Alzheimers Dis **15**(4): 589-603.
- Francis, R., G. McGrath, et al. (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." Dev Cell **3**(1): 85-97.
- Frautschy, S. A., A. Baird, et al. (1991). "Effects of injected Alzheimer beta-amyloid cores in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8362-8366.
- Frautschy, S. A., F. Yang, et al. (1996). "Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits." Neurobiol Aging **17**(2): 311-321.
- Gamblin, T. C., F. Chen, et al. (2003). "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 10032-10037.
- Games, D., D. Adams, et al. (1995). "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." Nature **373**(6514): 523-527.
- Gandy, S., R. B. DeMattos, et al. (2004). "Alzheimer's Abeta vaccination of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*)."
Mech Ageing Dev **125**(2): 149-151.
- Geula, C., C. K. Wu, et al. (1998). "Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity." Nat Med **4**(7): 827-831.
- Ghribi, O. (2008). "Potential mechanisms linking cholesterol to Alzheimer's disease-like pathology in rabbit brain, hippocampal organotypic slices, and skeletal muscle." J Alzheimers Dis **15**(4): 673-684.
- Ghribi, O., B. Larsen, et al. (2006). "High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus." Exp Neurol **200**(2): 460-467.
- Giaccone, G., L. Verga, et al. (1990). "Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in aged dogs." Neurosci Lett **114**(2): 178-183.
- Goldman, S. D. and J. P. Krise (2010). "Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo." J Biol Chem **285**(7): 4983-4994.
- Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau." J Biol Chem **276**(1): 529-534.
- Gotz, J. and L. M. Ittner (2008). "Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Nat Rev Neurosci **9**(7): 532-544.
- Gotz, J., A. Probst, et al. (1995). "Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform." EMBO J **14**(7): 1304-1313.
- Gotz, J., M. Tolnay, et al. (2001). "Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau." Eur J Neurosci **13**(11): 2131-2140.

- Graur, D., L. Duret, et al. (1996). "Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies)." Nature **379**(6563): 333-335.
- Grziwa, B., M. O. Grimm, et al. (2003). "The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted." J Biol Chem **278**(9): 6803-6808.
- Hamano, T., T. F. Gendron, et al. (2008). "Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression." Eur J Neurosci **27**(5): 1119-1130.
- Hartmann, T., J. Kuchenbecker, et al. (2007). "Alzheimer's disease: the lipid connection." J Neurochem **103 Suppl 1**: 159-170.
- Hauss-Wegrzyniak, B., P. Dobrzanski, et al. (1998). "Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease." Brain Res **780**(2): 294-303.
- Hernandez, P., G. Lee, et al. (2009). "Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide A β (25-35): involvement of lipid rafts." J Alzheimers Dis **16**(1): 149-156.
- Herzig, M. C., D. T. Winkler, et al. (2004). "A β is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis." Nat Neurosci **7**(9): 954-960.
- Hoglund, K., O. Wiklund, et al. (2004). "Plasma levels of beta-amyloid(1-40), beta-amyloid(1-42), and total beta-amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins." Arch Neurol **61**(3): 333-337.
- Holcomb, L., M. N. Gordon, et al. (1998). "Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes." Nat Med **4**(1): 97-100.
- Hollingsworth, P., D. Harold, et al. (2011). "Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **43**(5): 429-435.
- Hsiao, K., P. Chapman, et al. (1996). "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." Science **274**(5284): 99-102.
- Hudry, E., D. Van Dam, et al. (2010). "Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease." Mol Ther **18**(1): 44-53.
- Hutter-Paier, B., H. J. Huttunen, et al. (2004). "The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease." Neuron **44**(2): 227-238.
- Iijima, K. and K. Iijima-Ando (2008). "Drosophila models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42." J Alzheimers Dis **15**(4): 523-540.
- Iqbal, K., C. Alonso Adel, et al. (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 198-210.
- Ishihara, T., M. Hong, et al. (1999). "Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform." Neuron **24**(3): 751-762.
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, et al. (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.
- Janas, A. M., S. C. Cunningham, et al. (2005). "The cholinesterase inhibitor, phenserine, improves Morris water maze performance of scopolamine-treated rats." Life Sci **76**(10): 1073-1081.

- Jankowsky, J. L., L. H. Younkin, et al. (2007). "Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice." J Biol Chem **282**(31): 22707-22720.
- Jick, H., G. L. Zornberg, et al. (2000). "Statins and the risk of dementia." Lancet **356**(9242): 1627-1631.
- Johnstone, E. M., M. O. Chaney, et al. (1991). "Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis." Brain Res Mol Brain Res **10**(4): 299-305.
- Joshi, P., J. O. Liang, et al. (2009). "Amyloid precursor protein is required for convergent-extension movements during Zebrafish development." Dev Biol **335**(1): 1-11.
- Khatoon, S., I. Grundke-Iqbal, et al. (1992). "Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein." J Neurochem **59**(2): 750-753.
- Khurana, V. (2008). "Modeling Tauopathy in the fruit fly *Drosophila melanogaster*." J Alzheimers Dis **15**(4): 541-553.
- Kivipelto, M., E. L. Helkala, et al. (2001). "Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study." BMJ **322**(7300): 1447-1451.
- Klapdor, K. and F. J. van der staay (1996). "The Morris water-escape task in mice: strain differences and effects of intra-maze contrast and brightness." Physiol Behav **60**(5): 1247-1254.
- Kolb, B. and J. Walkey (1987). "Behavioural and anatomical studies of the posterior parietal cortex in the rat." Behav Brain Res **23**(2): 127-145.
- Kolsch, H., R. Heun, et al. (2004). "Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients." Neurosci Lett **368**(3): 303-308.
- Kolsch, H., D. Lutjohann, et al. (2003). "The role of 24S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease." J Nutr Health Aging **7**(1): 37-41.
- Kootstra, N. A. and I. M. Verma (2003). "Gene therapy with viral vectors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 413-439.
- Koschack, J., D. Lutjohann, et al. (2009). "Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals." Neurobiol Aging **30**(6): 898-902.
- Kotti, T. J., D. M. Ramirez, et al. (2006). "Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3869-3874.
- Kraemer, B. C., B. Zhang, et al. (2003). "Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9980-9985.
- Kurata, T., K. Miyazaki, et al. (2011). "Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice." Brain Res **1371**: 161-170.
- Kwok, J. B., C. T. Loy, et al. (2008). "Glycogen synthase kinase-3beta and tau genes interact in Alzheimer's disease." Ann Neurol **64**(4): 446-454.
- Lee, J. A. and G. J. Cole (2007). "Generation of transgenic zebrafish expressing green fluorescent protein under control of zebrafish amyloid precursor protein gene regulatory elements." Zebrafish **4**(4): 277-286.

- Lemere, C. A., A. Beierschmitt, et al. (2004). "Alzheimer's disease abeta vaccine reduces central nervous system abeta levels in a non-human primate, the Caribbean vervet." Am J Pathol **165**(1): 283-297.
- Lemere, C. A., J. Oh, et al. (2008). "Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top tamarins: a model of early Alzheimer's disease?" Rejuvenation Res **11**(2): 321-332.
- Leoni, V. and C. Caccia (2011). "Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases." Chem Phys Lipids.
- Lewis, J., D. W. Dickson, et al. (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." Science **293**(5534): 1487-1491.
- Lewis, J., E. McGowan, et al. (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." Nat Genet **25**(4): 402-405.
- Lim, F., F. Hernandez, et al. (2001). "FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain." Mol Cell Neurosci **18**(6): 702-714.
- Liu, J. P., Y. Tang, et al. (2010). "Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases." Mol Cell Neurosci **43**(1): 33-42.
- Liu, L., I. J. Orozco, et al. (2008). "A transgenic rat that develops Alzheimer's disease-like amyloid pathology, deficits in synaptic plasticity and cognitive impairment." Neurobiol Dis **31**(1): 46-57.
- Lossos, A., A. Reches, et al. (2003). "Frontotemporal dementia and parkinsonism with the P301S tau gene mutation in a Jewish family." J Neurol **250**(6): 733-740.
- Lu, F., X. Li, et al. (2010). "Inhibition of tau hyperphosphorylation and beta amyloid production in rat brain by oral administration of atorvastatin." Chin Med J (Engl) **123**(14): 1864-1870.
- Lu, J., D. M. Wu, et al. (2010). "Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity." J Pathol **222**(2): 199-212.
- Matsuoka, N., N. Maeda, et al. (1992). "Effect of FR121196, a novel cognitive enhancer, on the memory impairment of rats in passive avoidance and radial arm maze tasks." J Pharmacol Exp Ther **263**(2): 436-444.
- Mattson, M. P. (2003). "Neurobiology: Ballads of a protein quartet." Nature **422**(6930): 385, 387.
- McGowan, E., J. Eriksen, et al. (2006). "A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice." Trends Genet **22**(5): 281-289.
- Mendell, J. R., L. R. Rodino-Klapac, et al. (2010). "Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D." Ann Neurol **68**(5): 629-638.
- Micchelli, C. A., W. P. Esler, et al. (2003). "Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila." FASEB J **17**(1): 79-81.
- Miyasaka, T., Z. Ding, et al. (2005). "Progressive neurodegeneration in C. elegans model of tauopathy." Neurobiol Dis **20**(2): 372-383.
- Morgan, D., S. Munireddy, et al. (2008). "Apparent behavioral benefits of tau overexpression in P301L tau transgenic mice." J Alzheimers Dis **15**(4): 605-614.
- Morris, M. C. (2009). "The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence." Eur J Neurol **16 Suppl 1**: 1-7.

- Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." J Neurosci Methods **11**(1): 47-60.
- Mucke, L., E. Masliah, et al. (2000). "High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation." J Neurosci **20**(11): 4050-4058.
- Muramatsu, S., K. Fujimoto, et al. (2010). "A phase I study of aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease." Mol Ther **18**(9): 1731-1735.
- Myers, A. J., M. Kaleem, et al. (2005). "The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **14**(16): 2399-2404.
- Nelson, P. T., H. Braak, et al. (2009). "Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship." J Neuropathol Exp Neurol **68**(1): 1-14.
- Newman, M., I. F. Musgrave, et al. (2007). "Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models." Biochim Biophys Acta **1772**(3): 285-297.
- Newman, M., G. Verdile, et al. (2011). "Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research." Biochim Biophys Acta **1812**(3): 346-352.
- Novak, M., R. Jakes, et al. (1991). "Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5837-5841.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*." Nature **287**(5785): 795-801.
- Oakley, H., S. L. Cole, et al. (2006). "Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation." J Neurosci **26**(40): 10129-10140.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(8): 1063-1070.
- Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.
- Pallas, M., A. Camins, et al. (2008). "From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)." J Alzheimers Dis **15**(4): 615-624.
- Papassotiropoulos, A., D. Lutjohann, et al. (2002). "24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia." J Psychiatr Res **36**(1): 27-32.
- Patel, N. V., M. N. Gordon, et al. (2005). "Caloric restriction attenuates Abeta-deposition in Alzheimer transgenic models." Neurobiol Aging **26**(7): 995-1000.
- Pellow, S. and S. E. File (1986). "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat." Pharmacol Biochem Behav **24**(3): 525-529.
- Philipson, O., A. Lord, et al. (2010). "Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease." FEBS J **277**(6): 1389-1409.

- Podlisny, M. B., D. R. Tolan, et al. (1991). "Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease." Am J Pathol **138**(6): 1423-1435.
- Ramesh, B. N., T. S. Rao, et al. (2010). "Neuronutrition and Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **19**(4): 1123-1139.
- Ratovitski, T., H. H. Slunt, et al. (1997). "Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin." J Biol Chem **272**(39): 24536-24541.
- Reeves, R. H., N. G. Irving, et al. (1995). "A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits." Nat Genet **11**(2): 177-184.
- Refolo, L. M., M. A. Pappolla, et al. (2001). "A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **8**(5): 890-899.
- Reynolds, C. H., C. J. Garwood, et al. (2008). "Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases." J Biol Chem **283**(26): 18177-18186.
- Robinson, S. R., G. M. Bishop, et al. (2004). "Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget." Neurobiol Aging **25**(5): 609-615.
- Rockenstein, E., M. Mallory, et al. (2001). "Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42)." J Neurosci Res **66**(4): 573-582.
- Rockwood, K., S. Kirkland, et al. (2002). "Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people." Arch Neurol **59**(2): 223-227.
- Rosen, R. F., A. S. Farberg, et al. (2008). "Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee." J Comp Neurol **509**(3): 259-270.
- Russell, D. W., R. W. Halford, et al. (2009). "Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain." Annu Rev Biochem **78**: 1017-1040.
- Salminen, A., K. Kaarniranta, et al. (2011). "AMP-activated protein kinase (AMPK): a potential player in Alzheimer's disease." J Neurochem.
- Sanchis-Segura, C., R. Spanagel, et al. (2005). "Reduced sensitivity to sucrose in rats bred for helplessness: a study using the matching law." Behav Pharmacol **16**(4): 267-270.
- Santacruz, K., J. Lewis, et al. (2005). "Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function." Science **309**(5733): 476-481.
- Scearce-Levie, K. (2011). "Monitoring spatial learning and memory in Alzheimer's disease mouse models using the Morris Water Maze." Methods Mol Biol **670**: 191-205.
- Schafer, W. F. (2006). "Genetics of egg-laying in worms." Annu Rev Genet **40**: 487-509.
- Schindowski, K., A. Bretteville, et al. (2006). "Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits." Am J Pathol **169**(2): 599-616.
- Sergeant, N., A. Delacourte, et al. (2005). "Tau protein as a differential biomarker of tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 179-197.

- Shakes, L. A., T. L. Malcolm, et al. (2008). "Context dependent function of APPb enhancer identified using enhancer trap-containing BACs as transgenes in zebrafish." Nucleic Acids Res **36**(19): 6237-6248.
- Shie, F. S., L. W. Jin, et al. (2002). "Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice." Neuroreport **13**(4): 455-459.
- Shobab, L. A., G. Y. Hsiung, et al. (2005). "Cholesterol in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **4**(12): 841-852.
- Sierra, S., M. C. Ramos, et al. (2011). "Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death." J Alzheimers Dis **23**(2): 307-318.
- Simons, M., F. Schwarzler, et al. (2002). "Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial." Ann Neurol **52**(3): 346-350.
- Small, S. A. and K. Duff (2008). "Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis." Neuron **60**(4): 534-542.
- Smialowska, A. and R. Baumeister (2006). "Presenilin function in *Caenorhabditis elegans*." Neurodegener Dis **3**(4-5): 227-232.
- Solomon, A., V. Leoni, et al. (2009). "Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease." Neurosci Lett **462**(1): 89-93.
- Sparks, D. L. (2008). "The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the pilot." J Alzheimers Dis **15**(4): 641-656.
- Sparks, D. L., R. Friedland, et al. (2006). "Trace copper levels in the drinking water, but not zinc or aluminum influence CNS Alzheimer-like pathology." J Nutr Health Aging **10**(4): 247-254.
- Sparks, D. L., J. Lochhead, et al. (2002). "Water quality has a pronounced effect on cholesterol-induced accumulation of Alzheimer amyloid beta (Abeta) in rabbit brain." J Alzheimers Dis **4**(6): 523-529.
- Sparks, D. L., M. N. Sabbagh, et al. (2005). "Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results." Arch Neurol **62**(5): 753-757.
- Sparks, D. L., S. W. Scheff, et al. (1994). "Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol." Exp Neurol **126**(1): 88-94.
- Sparks, D. L. and B. G. Schreurs (2003). "Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 11065-11069.
- Spittaels, K., C. Van den Haute, et al. (1999). "Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein." Am J Pathol **155**(6): 2153-2165.
- Staubli, U., Z. Izrael, et al. (1996). "Remembrance of odors past: enhancement by central facilitation of AMPA receptors." Behav Neurosci **110**(5): 1067-1073.
- Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, et al. (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13287-13292.

- Takashima, A., M. Murayama, et al. (1998). "Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9637-9641.
- Takeda, T. (2009). "Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice." Neurochem Res **34**(4): 639-659.
- Tanemura, K., M. Murayama, et al. (2002). "Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau." J Neurosci **22**(1): 133-141.
- Tatebayashi, Y., T. Miyasaka, et al. (2002). "Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13896-13901.
- Tesseur, I., J. Van Dorpe, et al. (2000). "Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord." Am J Pathol **157**(5): 1495-1510.
- Tokita, K., T. Inoue, et al. (2005). "FK962, a novel enhancer of somatostatin release, exerts cognitive-enhancing actions in rats." Eur J Pharmacol **527**(1-3): 111-120.
- Turner, P. R., K. O'Connor, et al. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." Prog Neurobiol **70**(1): 1-32.
- Van Dam, D. and P. P. De Deyn (2006). "Drug discovery in dementia: the role of rodent models." Nat Rev Drug Discov **5**(11): 956-970.
- Van Dam, D., G. Lenders, et al. (2006). "Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains." Neurobiol Learn Mem **85**(2): 164-172.
- Van der Jeugd, A., T. Ahmed, et al. (2011). "Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission." Neurobiol Learn Mem **95**(3): 296-304.
- Vatish, M., E. Yamada, et al. (2009). "Fyn kinase function in lipid utilization: a new upstream regulator of AMPK activity?" Arch Physiol Biochem **115**(4): 191-198.
- Vaya, J. and H. M. Schipper (2007). "Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease." J Neurochem **102**(6): 1727-1737.
- Wahlsten, D. (2001). "Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations, and reality." Physiol Behav **73**(5): 695-704.
- Wahrle, S., P. Das, et al. (2002). "Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains." Neurobiol Dis **9**(1): 11-23.
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, et al. (2009). "Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing." Hum Mol Genet **18**(21): 4153-4170.
- Wilcock, D. M. and C. A. Colton (2008). "Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials." J Alzheimers Dis **15**(4): 555-569.
- Williamson, R., A. Usardi, et al. (2008). "Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism." FASEB J **22**(5): 1552-1559.
- Wisniewski, H., A. B. Johnson, et al. (1970). "Senile plaques and cerebral amyloidosis in aged dogs. A histochemical and ultrastructural study." Lab Invest **23**(3): 287-296.

- Wolozin, B., W. Kellman, et al. (2000). "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors." Arch Neurol **57**(10): 1439-1443.
- Wood, W. G., F. Schroeder, et al. (2002). "Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides." Neurobiol Aging **23**(5): 685-694.
- Woodruff-Pak, D. S. (2008). "Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications." J Alzheimers Dis **15**(4): 507-521.
- Woodruff-Pak, D. S., A. Agelan, et al. (2007). "A rabbit model of Alzheimer's disease: valid at neuropathological, cognitive, and therapeutic levels." J Alzheimers Dis **11**(3): 371-383.
- Woodruff-Pak, D. S. and M. E. Jaeger (1998). "Predictors of eyeblink classical conditioning over the adult age span." Psychol Aging **13**(2): 193-205.
- Woodruff-Pak, D. S. and M. Papka (1996). "Huntington's disease and eyeblink classical conditioning: normal learning but abnormal timing." J Int Neuropsychol Soc **2**(4): 323-334.
- Woodruff-Pak, D. S. and J. Q. Trojanowski (1996). "The older rabbit as an animal model: implications for Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **17**(2): 283-290.
- Yoshiyama, Y., M. Higuchi, et al. (2007). "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." Neuron **53**(3): 337-351.
- Zha, Q., Y. Ruan, et al. (2004). "GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein." Mol Psychiatry **9**(10): 946-952.