



Impact de l'excitotoxicité glutaminergique sur la pathologie amyloïde et le rôle des différents sous-types de monocytes sanguins dans ce processus

Mémoire

Yannick Tremblay

Maîtrise en médecine moléculaire

Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Yannick Tremblay, 2016

Impact de l'excitotoxicité glutaminergique sur la pathologie amyloïde et le rôle des différents sous-types de monocytes sanguins dans ce processus

Mémoire

Yannick Tremblay

Sous la direction de :

Serge Rivest, directeur de recherche

Résumé

De nombreux processus sont responsables du bon fonctionnement de l'organisme vivant. Ce dernier est entre autres muni de mécanismes de défense, de nettoyage et de régulation afin de maintenir son environnement en équilibre. Lorsque l'un ou plusieurs de ces mécanismes font défaut, à un ou différents niveaux, certaines pathologies cliniques peuvent survenir. C'est le cas notamment de la maladie d'Alzheimer (MA), la cause majeure de démence à travers le monde. Elle est caractérisée par l'enchevêtrement neurofibrillaire et/ou l'accumulation de la protéine amyloïde-bêta ($A\beta$) dans le parenchyme du cerveau. Appelée pathologie amyloïde, cette dernière est l'hypothèse de loin la plus discutée dans la littérature scientifique tentant d'expliquer la MA et présume sa cause par la défaillance d'élimination de ce peptide neurotoxique. Un autre joueur crucial dans la progression de la maladie est l'excitotoxicité glutaminergique, défini comme une excitation excessive des récepteurs neuronaux. Pouvant être induite par l' $A\beta$, l'excitotoxicité cause une partie de la neurodégénérescence. L'interaction entre ces deux phénomènes pourrait contribuer aux déficits cognitifs associés à la MA, tels que la perte de mémoire, les défaillances émotionnelles et les troubles comportementaux. L'étude présentée dans ce mémoire investigate les effets de la mort neuronale à la suite d'un dommage excitotoxique sur la progression de la maladie, s'attardant aux troubles cognitifs et moteurs, à la progression de la pathologie amyloïde de même que les fonctions des cellules immunitaires (monocytes et microglies). L'acide kainique (KA), un analogue conformationnel du glutamate, fut utilisé chez des souris au génotype « wild type » (WT) ou transgénique reproduisant la MA (APP/PS1_{swe}) de par la surproduction d' $A\beta$. L'injection unilatérale dans le striatum cause une détérioration de la santé générale de l'animal, de même que des troubles cognitifs et comportementaux, exacerbée chez la souris APP/PS1 comparativement au groupe contrôle. Après une lésion au KA, une diminution du nombre total de monocytes chez les souris MA en comparaison aux souris WT est aussi observée, entraînant conjointement un nombre de plaques et niveaux soluble d' $A\beta$ augmenté. Conséquemment avec la diminution des microglies, un nombre moins important de ces cellules immunitaires furent associées aux plaques. Ensemble, ces résultats suggèrent que les dommages excitotoxiques chez le modèle de souris Alzheimer déclenchent une accélération de la maladie, des déficits comportementaux et cognitifs plus importants, de même que des niveaux de la protéine toxique $A\beta$ plus élevés. Ceci serait probablement dû à l'impact de l'excitotoxine sur le système immunitaire et particulièrement sur l'appauvrissement de la quantité de microglies et monocytes. Par conséquent, l'élimination de l' $A\beta$ semble être affectée par les neurones en dégénérescence provoquant l'aggravation de la pathologie amyloïde.

Abstract

A large number of processes are responsible for the proper functioning of living organisms. These are provided among others by mechanisms for self defence, cleaning and regulation in order to maintain the environment stable. When one or more of these mechanisms are lacking, some clinical pathology can occur. This is the case of Alzheimer's disease (AD), the major cause of dementia worldwide. It is characterized by neurofibrillary tangles and/or the accumulation of amyloid beta ($A\beta$) in the brain. The amyloid pathology hypothesis is by far the most talked about in scientific literature trying to explain AD and presumed it to be caused by a defective elimination of this neurotoxic peptide. Another substantial player for disease progression is glutamate excitotoxicity, defined as over excitation of neuronal receptor. Being exacerbated by $A\beta$, excitotoxicity causes a part of the neurodegeneration. The interplay of these two phenomena might contribute to cognitive deficits in AD, such as memory loss, emotional failures and behavioural disorders. The study presented in this memoir investigates the effects of neuronal death following an excitotoxic insult the progression of the illness, focusing on cognitive and motor deficits, the progression of the amyloid pathology as well as the immune cells functions (microglia and monocyte). Kainic acid (KA), a conformational analog of glutamate, was unilaterally injected in the striatum of wild type or transgenic AD mice (APP/PS1) overproducing $A\beta$. The injections caused a general deterioration of the health of the mice as well as behavioural and cognitive deficits that were exacerbated in APP/PS1 mice compared to their control. We observed a decrease in the total number of monocytes in AD mice, leading to an increase of the number of $A\beta$ plaques and soluble $A\beta$ in KA-lesioned APP/PS1 mice compared to their sham. Consistently with the decrease of microglia, a smaller number of immune cells was associated with the plaques. Taken together, these results suggest that excitotoxic insult in an AD mouse model triggers an acceleration of the disease with the behavioural and cognitive impairments as well as an increment in the levels of the toxic protein $A\beta$. Likely, these is due to the impact of the excitotoxin on the immune system and in particular on the decreased levels of microglial cells as well as monocytes. Thus, the clearance of $A\beta$ seems affected by dying neurones resulting in the worsening of the amyloid pathology.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements.....	xii
Avant-propos	xiii
1.Introduction.....	1
1.1 La maladie d’Alzheimer	1
1.1.1 Historique	2
1.1.2 Symptômes	2
1.1.3 Formes de la maladie.....	3
1.1.3.1 La forme familiale	3
1.1.3.2 La forme sporadique.....	3
1.1.4 Hypothèses étiologiques.....	4
1.1.4.1 Hypothèse de la protéine Tau	4
1.1.4.2 Hypothèse de l’amyloïde-bêta	5
1.1.4.2.1 Rôle de la protéine précurseur de l’amyloïde (APP).....	6
1.1.4.2.2 Rôle de l’A β	7
1.1.4.2.3 Hypothèse de la cascade amyloïde	9
1.2 Immunité cellulaire.....	10
1.2.1 Immunité innée.....	11
1.2.1.1 Réponse inflammatoire.....	11
1.2.2 Immunité adaptative	12
1.2.2.1 Les signaux d’avertissement.....	13
1.2.2.2 Récepteurs impliqués.....	13
1.2.3 Leucocytes.....	15
1.2.3.1 Monocytes	15
1.3 Système nerveux central.....	16

1.3.1 Barrière hématoencéphalique	16
1.3.2 Composition cellulaire.....	17
1.3.2.1 Fonctionnement neuronal	17
1.3.2.1.1 Neurones affectés chez les patientes MA	18
1.3.2.2 Les cellules gliales.....	18
1.3.2.2.1 Oligodendrocytes et astrocytes	18
1.3.2.2.2 Microglies.....	19
1.4 Accumulation de l'amyloïde-bêta	21
1.4.1 Agrégation de l'A β	21
1.4.2 Élimination	22
1.4.3 Défaillance dans l'élimination.....	23
1.4.4 Activation microgliale en contexte MA	24
1.4.4.1 Mécanisme de phagocytose.....	25
1.4.5 Modèle murin	26
1.5 Excitotoxicité.....	27
1.5.1 Mécanisme de mort neuronale.....	27
1.5.1.1 Récepteurs impliqués.....	28
1.5.1.2 Réponse à la mort neuronale	29
1.5.2 Acide kaïnique.....	29
2. Résultats de recherche	31
2.1 Résumé	32
2.2 Abstract	33
2.3 Introduction	34
2.4 Material and Methods.....	35
2.4.1 Mice.....	35
2.4.2 Kainic acid intracerebral injection.....	36
2.4.3 Behavioral analyses	36
2.4.3.1 Nesting behavior.....	36
2.4.3.2 Water T-maze	36
2.4.3.3 Neurological evaluation.....	37
2.4.3.4 Rotarod	37
2.4.4 Flow Cytometry Analysis.....	37
2.4.5 Tissue Collection.....	38
2.4.6 In situ hybridization.....	38
2.4.7 Immunohistochemistry	39

2.4.7.1 Fluoro-Jade β (FJB) staining	39
2.4.7.2 Congo red	39
2.4.7.3 Immunohistochemistry	40
2.4.7.4 Immunohistochemistry and CongoRed	40
2.4.8 Western Blot analysis of brain sample	40
2.4.9 Elisa for soluble A β 40 and A β 42	41
2.4.10 Stereological Analyses and image acquisition	41
2.4.11 Statistical Analyses.....	41
2.4.12 Image preparation.....	42
2.5 Results	42
2.5.1 KA injection exacerbates cognitive impairment in AD context.....	42
2.5.2 Neuronal death is aggravated by excitotoxic insult in AD mice.	43
2.5.3 KA lesions affect the peripheral and central immune system	44
2.5.4 KA injection leads to an overproduction of A β and reduction of microglial cell associated with plaques.....	46
2.6 Discussion	48
2.7 Conclusion.....	49
2.8 Acknowledgments	50
2.9 Supplementary	51
2.10 Références	52
3. Discussion	54
3.1 Retour sur les résultats.....	54
3.1.1 Aggravation des déficits cognitifs	54
3.1.2 Inhibition du recrutement monocytaire	56
3.1.3 Aggravation de la pathologie amyloïde.....	58
3.2 Synergie entre l'excitotoxicité et la maladie d'Alzheimer	60
3.3 Perspectives futures.....	61
3.4 Potentiel clinique.....	62
4. Conclusion.....	63
Références	64

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 Différents récepteurs impliqués dans l'immunité innée.	14
Tableau 2.2 Différents TLRs impliqués dans l'immunité innée.....	14

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Étendu des dépôts protéiques selon la progression de la maladie d'Alzheimer.....	6
Figure 1.2 Clivage de l'APP menant à l'A β	7
Figure 1.3 Rôle physiologique et pathologique de l'A β	8
Figure 1.4 Développement de la maladie d'Alzheimer.....	9
Figure 1.5 Formation des composantes cellulaires sanguines.....	10
Figure 1.6 Signalisation des voies TLRs.....	20
Figure 1.7 Différentes formes de l'A β	22
Figure 1.8 Mécanismes d'élimination de l'A β	23
Figure 1.9 Migration des cellules microgliales vers l'A β	25
Figure 1.10 Voies d'excitotoxicité causé par l'A β	28

Chapitre 2

Figure 2.1 Kainic acid (KA) intrastriatal injections aggravate behavioral phenotype in APP ^{swe} /PS1 mice.....	43
Figure 2.2 Neuronal death is exacerbated in APP ^{swe} /PS1 mice following KA injection.....	44
Figure 2.3 Decreased levels of monocytes following intrastriatal KA administration in APP/PS1 mice.....	45
Figure 2.4 Impact of KA injections on the immune response.....	46
Figure 2.5 KA injection triggers a sustained overproduction of β -amyloid (A β).....	47
Figure 2.6 Stereotaxic injection in the right striatum from bregma coordinates.....	51
Figure 2.7 Area from bregma coordinates where stereological analyses were performed.....	51

Chapitre 3

Figure 3.1 Intrastriatal injection of KA deregulates transmembrane protein mRNAs expression in the brain of APP ^{swe} /PS1 mice.....	58
---	----

Liste des abréviations

A β	Bêta-amyloïde
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
APP	Amyloid precursor protein
BACE1	β -sécrétase 1
BHE	Barrière hématoencéphalique
CAM	<i>Cellular adhesion molecule</i>
CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
HMGB1	<i>DNA-binding protein high-mobility group box 1 protein</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
IDE	<i>Insuline degradating enzyme</i>
IFN- β	Interféron- β
IL	Interleukin
KA	Acide kainique
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP-1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC-II	Complexe majeur d'histocompatibilité II
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NMDA	Récepteurs N-méthyl-D-aspartate
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS1	Prenesilin-1
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation end products</i>
SNC	Système nerveux central
STAB1	Stabilin-1
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	Recepteur Toll-like
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
WT	«Wild-Type»

“Le suicide de l’âme, c’est de penser mal”

— Victor Hugo

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Serge Rivest, qui m'a permis de réaliser mes études de deuxième cycle dans son laboratoire. Ce fut un réel bonheur que d'être formé sous ses conseils toujours pertinents et motivants. De plus, je suis honoré, privilégié, d'avoir eu la chance d'apprendre au sein de son équipe qui, à mes yeux aucunement impartiaux, est la meilleure d'entre tous.

Je tiens aussi à souligner l'importance capitale qu'a jouée le Dr Jean-Philippe Michaud dans mon cheminement. Sans lui, je ne me serais définitivement pas rendu aussi loin. Il m'a d'abord donné ma première chance en me permettant à l'été 2013 de faire un stage sous sa tutelle. Je ne cessai d'être impressionné par ses compétences scientifiques — qui d'ailleurs m'impressionnent encore à ce jour — et je voulais, grâce à lui, poursuivre mes études au deuxième cycle. Il a, par la suite, répondu à toutes mes questions, m'a aidé dans mes projets, bref il a été d'un soutien en tout point de vue. Dans le même ordre de pensée, je voudrais remercier les scientifiques, collègues et amis que j'ai eu la chance de côtoyer à chaque jour passé au laboratoire. Ainsi, un énorme merci à Marc-André, Antoine, Giulia, Maude, Audrey, Roxanne, Prenitha, Nataly, Marie-Michèle et Paul pour votre aide toujours apprécié, vos connaissances toujours utiles et vos discussions toujours passionnantes.

D'un point de vue plus personnel, il m'est impossible de ne pas souligner l'importance qu'ont joué mes parents, à qui je dédie ce mémoire, au courant des mes études graduées. Ils ont fortement contribué à ma réussite puisqu'ils constituèrent un soutien moral, une source d'inspiration, de même qu'une source de motivation. Je leur dois beaucoup. Parlant de motivation, trois personnes qui me sont chères furent présentes à chaque fois qu'un moment d'incertitudes, de doutes ou d'échecs survint afin de me rassurer et de me conseiller. À vous, Vanessa, Tommy et Fabienne, je vous remercie le plus sincèrement d'être aussi disponibles, compréhensifs, loyaux, attentifs et indulgents. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui et n'aurais certainement pas cheminé aussi loin sans votre support et votre amour inconditionnel.

Je souhaite donc partager ce mémoire avec les gens importants dans ma vie qui contribuèrent de près ou de loin à cet extraordinaire accomplissement.

Avant-propos

Ce mémoire, divisé en 4 chapitres, présente les résultats de mon projet de recherche effectué lors des mes études graduées

Le chapitre 1 expose les notions pertinentes à la compréhension de mon projet de recherche, de même que mes hypothèses et objectifs expérimentaux. Le chapitre 3 est la discussion des résultats alors que le chapitre 4 conclut le mémoire.

Le chapitre 2 se concentre sur l'article en voie de soumission dont je suis l'auteur principal :

Tremblay Y, Bellavance MA, Michaud JP, Cisbani G and Rivest S. (2016) Excitotoxic Insult in Alzheimer's Disease Mouse Model Accelerates The Disease Progression

Les expérimentations ont été réalisées par moi-même, Jean-Philippe Michaud et Marc-André Bellavance. Les mêmes personnes analysèrent les résultats, avec l'aide de Giulia Cisbani. L'article a été écrit par moi, révisé par Giulia Cisbani et corrigé par Dr Serge Rivest. Le projet lui-même fut encadré par Dr Serge Rivest.

À titre informatif, voici l'autre article produit durant mes études de 2^e cycle :

Michaud JP, Moreno P, **Tremblay Y** and Rivest S. The impact of Ly6C^{low} monocytes following cerebral hypoxia-ischemia in adult mice. (Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2014 , doi: 10.1038/jcbfm.2014

1. Introduction

Chaque être vivant — ou plutôt organisme pluricellulaire — dispose de mécanismes très régulés afin de maintenir en équilibre certaines constantes de son milieu intérieur. On appelle ce principe «homéostasie». De nombreux facteurs, tels que les ions, l'acidité et la température peuvent déréguler cet équilibre. Ils sont ainsi contrôlés entre autres par le rythme cardiaque, la miction, la sudation ou encore l'activité cellulaire (Hall, 2015). Autre constante pouvant dérégler cet équilibre: les infections microbiennes. Ces dernières affectent l'organisme de telle sorte qu'il ne peut plus fonctionner normalement. Il se doit, de ce fait, d'être muni de mécanismes de défense afin de répondre aux multiples pathogènes environnementaux. On englobe ces mécanismes avec les termes «immunité cellulaire» et «réponse inflammatoire». Plus précisément, dans le système nerveux central, la barrière hémato-encéphalique contrôle l'homéostasie ionique et moléculaire alors que les cellules gliales (micro/astro-gliale) sont responsables de la réponse immunitaire (Ransohoff et Brown, 2012). Toutefois, lorsque l'un ou plusieurs de ces mécanismes font défaut, à un ou différents niveaux, certaines pathologies cliniques peuvent subvenir.

1.1 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause majeure de démence chez la population vieillissante, et ce à travers le monde. On estime à ce jour plus de 46 millions de patients atteints de la MA ou d'une démence apparentée (Prince *et al.*, 2015). D'ici 2050, ce nombre est, selon les prédictions, destiné à quadrupler (Reitz et Mayeux, 2014). Des chiffres si faramineux ne sont pas sans conséquence: les coûts engendrés mondialement représentent la 18^e plus importante économie, une somme de plus de 800 milliards de dollars (US)

(Prince *et al.*, 2015). Les recherches biomédicales sont, de ce fait, indispensables afin d'améliorer la qualité de vie des patients, mais aussi diminuer les coûts sociaux.

1.1.1 Historique

Bien que les premiers cas documentés de divagation psychotique et de déclin des capacités mentales apparaissent à l'époque de l'Antiquité (Berchtold et Cotman, 1998), ce n'est que vers la fin du 19^e siècle que l'on précise concrètement le terme «démence» afin de décrire tous types de désordres psychologiques et cérébraux chez les patients de l'époque (Berrios, 1990). C'est alors qu'en 1906 aura lieu une lecture publique, du Dr Alois Alzheimer, dans laquelle se trouve une description d'une forme particulière de démence — ce qui deviendra subséquemment la MA — chez une patiente qu'il avait observée (Maurer *et al.*, 1997). Parmi ses constats, ce retrouvaient les déficits cognitifs et moteurs de la dame, de même que l'analyse post-mortem de son cerveau, révélant des dépôts protéiques et des nœuds neurofibrillaires (Hodges, 2006). Les années suivantes furent consacrées, par les chercheurs, à démystifier les particularités de la MA et justifier les résultats de cette maladie comme étant anormal dans le vieillissement humain (Berchtold et Cotman, 1998).

1.1.2 Symptômes

D'un point de vue clinique, l'on observe chez les patients aux prises avec la MA une destruction progressive des cellules du cerveau, induisant ultimement des déficits cognitifs. Les aspects les plus affectés lors des stades précoces de la maladie sont la mémoire (épisodique et spatial) et la résolution de problème, ne permettant pas aux patients de se rappeler certains événements à court terme et complexifiant l'orientation dans l'espace ou le temps (Alzheimer's association, 2015). Lorsque l'on atteint les stades plus avancés, certains troubles émotionnels et comportementaux peuvent être remarqués chez les patients, se traduisant par une agressivité accrue et par une incapacité à réaliser les tâches domestiques. (Alzheimer's association, 2015). Bien que cela diffère entre

chaque cas, lorsque le diagnostic de la MA est prononcé chez une personne caucasienne âgée de 65 ans et plus, un nombre moyen de 3 à 9 années est estimé pour la survie (Querfurth et Laferla, 2010). Ceci représente une diminution médiane de 1 à 3 années comparativement aux personnes saines du même âge (Helzner *et al.*, 2008).

1.1.3 Formes de la maladie

Il existe deux types de la MA, soit la forme familiale, qui débute de façon précoce (chez les moins de 60 ans), ou encore la forme sporadique, qui est plus tardive et progresse dès l'âge de 65 ans (Reitz et Mayeux, 2014). Les symptômes sont toutefois approximativement les mêmes, qu'importe la forme dont la personne est atteinte (Lippa *et al.*, 1996).

1.1.3.1 La forme familiale

Cette forme, qui est héréditaire de l'un des parents, tire son origine de mutations autosomales dominantes de certains chromosomes, tel que le chr21 affectant le gène *APP*, le chr14 affectant le gène *PSENI* où encore le chr1 affectant le gène *PSEN2* (Barber, 2012). Tous ces gènes sont impliqués dans la production de l'A β . Très rare, elle représente moins de 5% des gens atteints de la MA et elle est distinguée par le commencement très tôt des symptômes dans la vie du patient, parfois dès l'âge de 30 ans (Reitz et Mayeux, 2014).

1.1.3.2 La forme sporadique

Tardive, cette forme est diagnostiquée vers l'âge de 65 ans et touche la majorité de patients (95 %) (Alzheimer's association, 2015). Le déclin progressif des fonctions cognitives peut être causé par des facteurs environnementaux et le style de vie. En effet, des antécédents de diabète, d'hypertension, de tabagisme, d'obésité,

d'hypercholestérolémie ou encore le syndrome de Down sont avérés être des facteurs augmentant les probabilités d'avoir la MA (Mayeux et Stern, 2012). En outre, des mutations de gènes non dominants impliqués dans les mécanismes de l'amyloïde, le système immunitaire ou encore le métabolisme des lipides furent observées comme des facteurs de risque chez ce type de patients. On dénote entre autres les locus *ApoE*, *CLU* *CRI* ou *PICALM* (Rao *et al.*, 2013; Bettens *et al.*, 2013).

1.1.4 Hypothèses étiologiques

En raison de son dépistage tardif et de ses caractéristiques difficilement observables en clinique chez l'humain, les hypothèses expliquant les causes de la maladie restent limitées. Elle est causée par une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et de style de vie ayant tous des répercussions sur le cerveau à travers le temps. Bien que les causes ne soient pas entièrement connues, les effets sur les cerveaux sont mieux définis: c'est surtout l'analyse post-mortem des cerveaux d'individus atteints qui permet de mettre en lumière la pathogenèse de la MA. Ainsi, deux observations sont récurrentes chez une majorité de patients: d'abord une hyperphosphorylation de la protéine Tau la dissociant des microtubules des axones et menant à des nœuds neurofibrillaires. Ensuite, une agglomération de la protéine amyloïde-bêta ($A\beta$) sous différentes formes toxiques. Ces deux particularités, bien que causant individuellement de sévères lésions moléculaires, pourraient dans certains cas intervenir en synergie chez les patients, exacerbant la pathologie de dégénérescence neuronale et par le fait même les symptômes médicaux (Ittner et Götz, 2011). Le présent mémoire décrit les deux protéines citées précédemment, mais se concentrera principalement sur l' $A\beta$, puisqu'elle représente selon plusieurs la majeure composante dans le développement de la maladie.

1.1.4.1 Hypothèse de la protéine Tau

Tau est la protéine majeure associée aux microtubules des neurones et a pour but d'interagir avec les tubulines des axones afin de moduler leur stabilité, leur

organisation et l'acheminement intracellulaire (Iqbal *et al.*, 2010, Kalorova *et al.*, 2012). Chez les patients ayant la MA, l'on observe une hyperphosphorylation deux à trois fois supérieure de ce peptide normalement soluble par rapport aux personnes saines (Iqbal *et al.*, 2010), le rendant insoluble et diminuant son affinité aux microtubules (Querfurth et Laferla, 2010). Suivra son détachement des microtubules, puis un enchevêtrement progressif des neurones. D'ailleurs, le nombre de nœuds neurofibrillaires pourrait être un bon indicatif de la sévérité de la maladie du patient (Querfurth et Laferla, 2010). Ultimement, il en résulte une perte des fonctions dans le transport axonal puisqu'en de telles conditions, le transport de vésicule le long des microtubules est inhibé, l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) est altérée et l'influx nerveux ne peut circuler adéquatement (Kolarova *et al.*, 2012)

1.1.4.2 Hypothèse de l'amyloïde-bêta

Il est aussi observé fréquemment chez les patients atteints de la MA une accumulation de la protéine $\text{A}\beta$ sous forme de plaques dans le parenchyme extracellulaire du cerveau (**Figure 1.1**). De loin l'hypothèse la plus abordée dans la littérature scientifique concernant la MA, cette formation des plaques séniles surviendrait en amont de l'hypothèse des nœuds fibrillaires provoqués par la protéine Tau, et pourrait même en être la cause (Ittner et Götz, 2011). Le peptide $\text{A}\beta$, formé du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), fait l'objet d'une plus grande description dans la section 1.4.

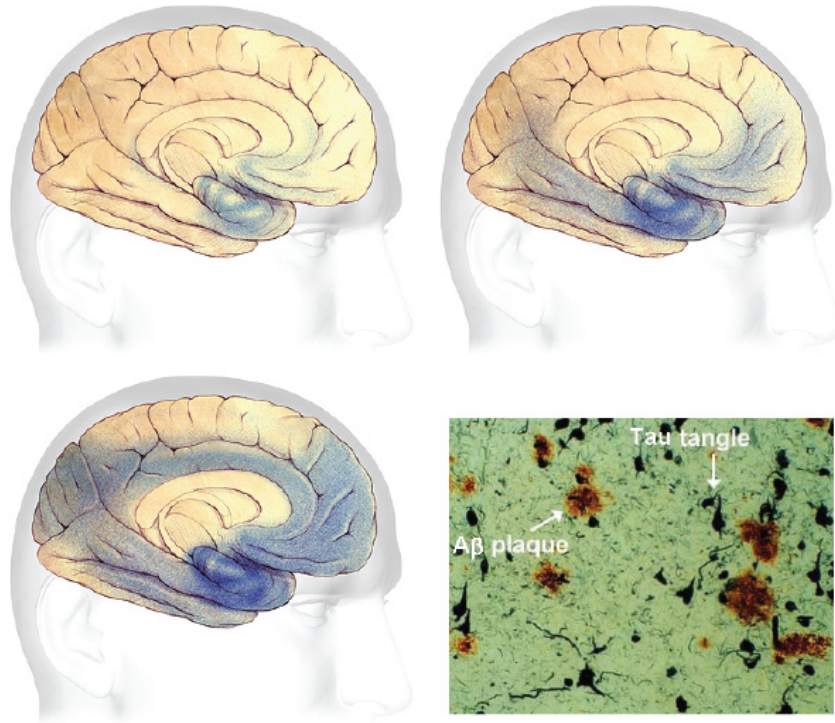


Figure 1.1 Étendu des dépôts protéiques selon la progression de la maladie d'Alzheimer. La zone bleue dans les cerveaux représente la couverture l'A β et Tau aux stades précoce, modéré et avancé. Le marquage moléculaire représente la protéine A β et Tau respectivement en brun et noir sur un tissu de cerveau humain post-mortem atteint d'Alzheimer. Adaptée de Alzheimer's Association, 2016 & O'Brien, R., 2015, Aging Neurosciences

1.1.4.2.1 Rôle de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

L'APP est une structure protéique conservée dans l'évolution qui, en condition normale, a un rôle plus ou moins bien défini (Guo *et al.*, 2011). Elle est produite en grande quantité dans les neurones et est métabolisée rapidement (O'Brien et Wong, 2011). C'est avec l'aide d'animaux transgénique, où l'on inactive le gène APP, que l'on peut déterminer ses fonctions. Effectivement, le développement de tels animaux est altéré, puisqu'ils présentent à l'âge adulte des poids corporels et cérébraux diminués (Guo *et al.*, 2011). Également, l'on observe chez ces animaux des anomalies métaboliques et des troubles comportementaux (Hiltunen *et al.*, 2009). D'un point de vue moléculaire, l'APP a des fonctions entre autres dans la croissance du corps cellulaire des neurones, les fonctions synaptiques, l'adhésion cellulaire et la réponse aux dommages cérébraux (excitotoxicité, ischémie) (Panegyres et Atkins, 2011).

Le clivage séquentiel de l'APP par les enzymes α -sécrétase ou β -sécrétase (bêta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE 1) et subséquemment par l'enzyme γ -sécrétase, mène dans le premier cas au fragment p3 ou dans la deuxième voie au peptide A β (**Figure 1.2**) (Wildsmith *et al.*, 2013). En condition normale, l'APP est préférentiellement clivé (~90%) par l' α -sécrétase, alors qu'une portion minoritaire est clivée par la β -sécrétase, résultant à la formation de l'A β par la γ -sécrétase (Hiltunen *et al.*, 2009). C'est ce dernier qui est impliqué dans la MA à cause entre autres de sa toxicité.

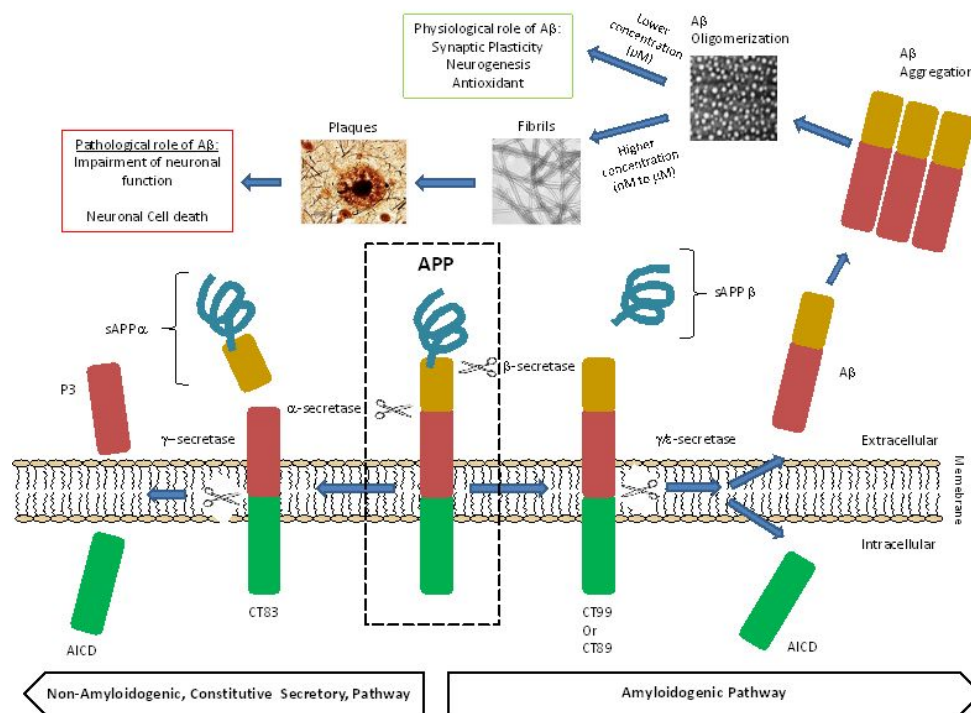


Figure 1.2 Clivage de l'APP menant à l'A β . Représentation des voies possibles de clivage de l'APP, soit initialement par l' α -sécrétase ou la β -sécrétase, donnant un fragment qui sera subséquemment coupé par la γ -sécrétase. La voie de la β -sécrétase mène à la production du peptide A β . Tirée de Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014, Neurochemistry

1.1.4.2.2 Rôle de l'A β

Bien que l'APP semble avoir un rôle bénéfique au niveau physiologique, l'A β , selon sa concentration, est impliqué dans des mécanismes contradictoires (**Figure**

1.3; Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014). Ce dernier, lorsque présent à de bas niveaux dans les cerveaux (état normalement observé sous forme soluble), est important pour l'apprentissage, la viabilité neuronale de même que pour la potentialisation de l'influx nerveux dans l'hippocampe (mémoire à moyen et long terme) (Morley *et al.*, 2010; Panegyres *et al.*, 2011). En culture cellulaire, lorsqu'on inactive les protéases responsables de la formation de l'A β ou élimine la protéine elle-même, l'on observe une mort neuronale ou encore une excitabilité neuronale incontrôlée (Pearson et Peers, 2006). Ceci dénote l'importance que joue l'A β en concentration de l'ordre du picomolaire. Cependant, une surproduction de cette protéine à des effets plutôt néfastes. En fait, lorsque la concentration d'A β se situe dans l'intervalle du nanomolaire jusqu'au micromolaire, il se produit les mêmes effets que lorsque la protéine est absente: déficience mémorielle et comportementale, cytotoxicité, mort neuronale, etc. (Benilova *et al.*, 2012). C'est donc dire que les niveaux d'A β doivent rester infimes afin d'assurer leurs fonctions sans provoquer des effets indésirables et néfastes. C'est, ceci dit, exactement ce qui se produit chez les patients atteints de la MA. D'ailleurs, des mutations touchant l'APP et réduisant son clivage en A β réduirait le risque de développer la MA (Jonsson *et al.*, 2012). Dans les mêmes ordres d'idées, c'est cette plus grande production d'A β observé chez les patients qui serait la cause de la maladie. On appelle cette théorie «la cascade amyloïde».

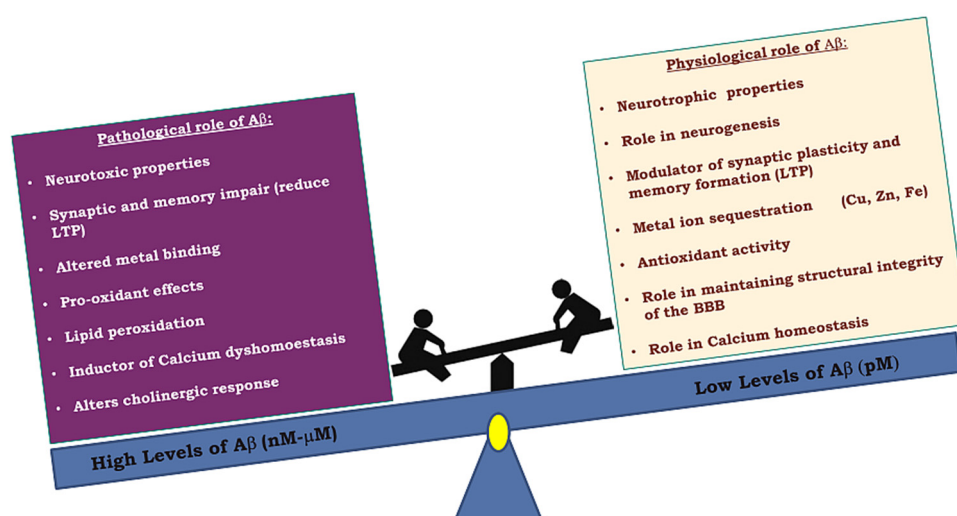


Figure 1.3 Rôle physiologique et pathologique de l'A β . Implication contradictoire de l'A β selon sa concentration. Tirée de Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014, Neurochemistry

1.1.4.2.3 Hypothèse de la cascade amyloïde

L'agrégation protéique serait causée par différents facteurs, parfois environnementaux, tantôt génétiques, d'autre fois héréditaires. Quoiqu'il en soit, différentes formes d'A β , ayant toutes des toxicités qui leur sont propres, sont produites et s'accumulent dans le cerveau (Karran *et al.*, 2011). En réponse à ces dépôts protéiques s'enchaîne une cascade d'événements menant ultimement à la MA (**Figure 1.4**). D'abord, plusieurs facteurs de stress dont l'altération de la réponse cholinergique, la dérégulation calcique, la réponse inflammatoire ou encore le stress oxydatif se produisent dans le système nerveux central (SNC) (Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014). Cela provoquera une toxicité synaptique et neuronale, qui mènera à une dégénérescence et une mort des neurones. C'est en dernier lieu que surviendront la démence et les symptômes cliniques tels que nous les connaissons (Hardy et Selkoe, 2002).

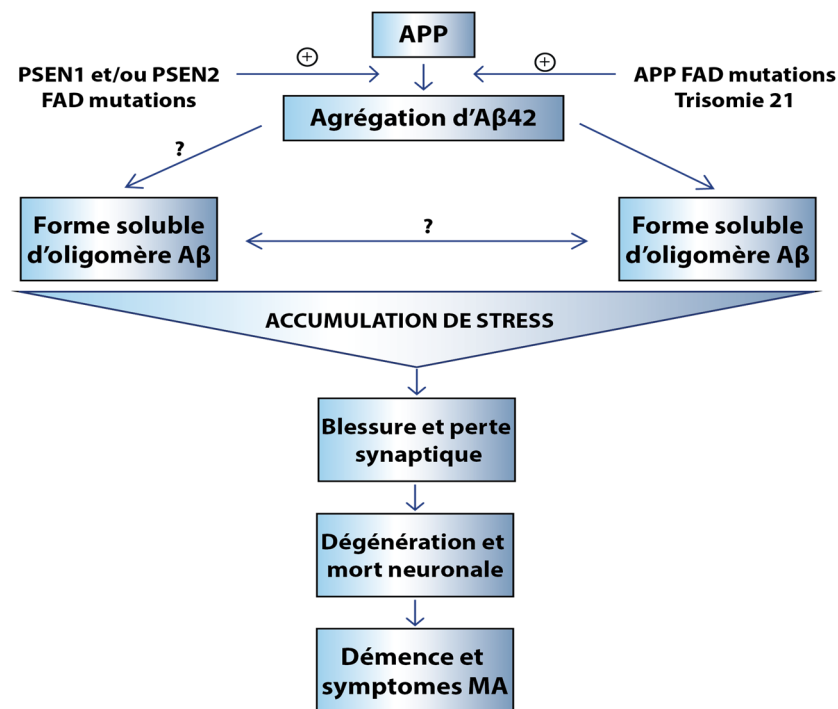


Figure 1.4 Développement de la maladie d'Alzheimer. L'hypothèse de la cascade amyloïde soutient l'accumulation de l'A β jusqu'à l'obtention de déficits cognitifs. Adapté de Karran *et al.*, 2011, Nature Reviews Drug Discovery

1.2 Immunité cellulaire

Plusieurs éléments suggèrent l'importante implication du système immunitaire dans la MA. En fait, l'activation chronique des cellules immunitaire serait un facteur promouvant la progression de la MA (Heneka *et al.*, 2015). Que ce soit dans la périphérie ou dans le système nerveux, deux types de réponse peuvent s'orchestrer, soit l'innée ou l'adaptative, dépendamment des cellules impliquées. Les composantes cellulaires retrouvées dans le sang humain proviennent des cellules souches hématopoïétiques (HSC) (Chaplin, 2010). À partir de ces cellules seront formés entre autres les thrombocytes (plaquettes), les érythrocytes (globules rouges), les lymphocytes ou encore les leucocytes (globules blancs) (Figure 1.5)

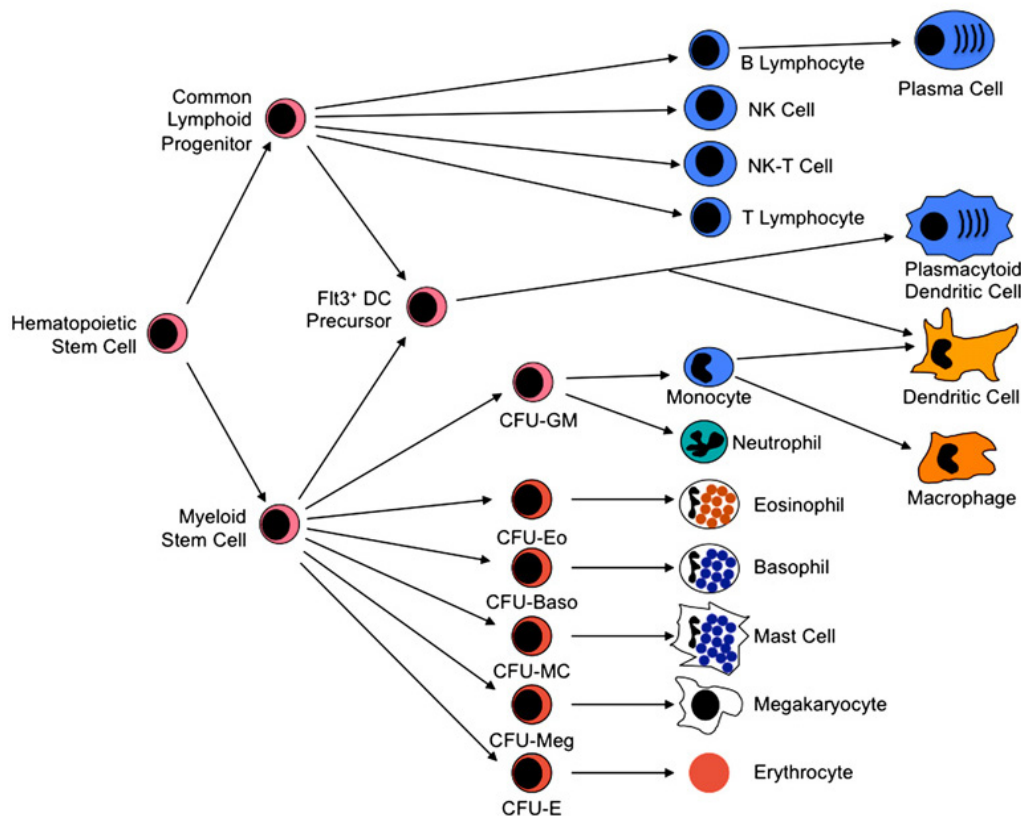


Figure 1.5 Formation des composantes cellulaires sanguines. Production des érythrocytes, lymphocytes et leucocytes à partir des cellules souches hématopoïétiques. Adapté de Chaplin *et al.*, 2011, *Allergy and clinical Immunology*

1.2.1 Immunité innée

L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme et est non spécifique. Elle correspond à une réponse inflammatoire induite par les leucocytes, plus précisément les cellules phagocytaires telles que les monocytes/macrophages et granulocytes dans la périphérie ou les microglies et les astrocytes dans le système nerveux (Mogensen, 2009; Ransohoff et Brown, 2012). Ces cellules jouent un rôle dans l'activation et l'arrangement de l'immunité adaptative et ont pour but d'éliminer au site d'inflammation les aspects non voulus présents dans l'environnement (pathogènes, antigène indésirable, débris cellulaire, etc.) (Britschgi et Wyss-Coray, 2007). Elles sont ainsi recrutées au site de lésion via différents signaux de stress reconnus grâce à différents récepteurs permettant une large couverture de défense possible (Blach-Olszewska, 2005). Ces cellules participent à la réponse immunitaire en produisant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α et IL-1 β) contribuant à leur activation, des facteurs de croissance augmentant la prolifération cellulaire (M-CSF), des chimiokines modulant le recrutement cellulaire (MCP-1) de même que des médiateurs promouvant la survie neuronale (BDNF) (Britschgi et Wyss-Coray, 2007). Toutefois, lorsque la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante, la réponse adaptative est requise.

1.2.1.1 Réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse immunitaire spécialisée qui est nécessaire, voire même cruciale, pour éliminer un pathogène, nettoyer un tissu apoptotique/nécrotique ou encore promouvoir la guérison cicatricielle (Carson *et al.*, 2006). Les cellules de défense de l'organisme (leucocytes) reconnaissent le pathogène ou encore les signaux de dommages via leurs récepteurs et engendrent une production de molécules afin d'initier leur élimination (Willey *et al.*, 2008). Parmi la cascade d'événements se retrouve le recrutement d'autres cellules au site lésé (nécessitant l'adhésion cellulaire grâce aux molécules de la famille CAM) et ultimement l'élimination de la cible (par

internalisation, phagocytose ou dégradation via la sécrétion de molécule) (Khan et Khan, 2010). Les effets métaboliques de ces cellules sont entre autres activés par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), le Tumor Necrosis Factor (TNF) (Khan et Khan, 2010). Une inflammation aberrante ou chronique causera à l'inverse du dommage aux tissus avoisinant et, si le site inflammatoire se retrouve dans le CNS, de la neurodégénérescence (Skokowa *et al.*, 2006). En effet, un processus inflammatoire prolongé, qui a pour but d'activer les cellules immunitaires, intensifiera ultimement leur activation. Il en résultera en la toxification du milieu via la production accrue de molécules pro-inflammatoires, de même que des intermédiaires toxiques (oxyde nitrique, enzymes protéolytiques, espèces réactives à l'oxygène, radicaux libres) (Blasko et Grubeck-Loebenstein, 2003)

1.2.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative est quant à elle spécifique et procure une résistance aux molécules dont l'organisme a été préalablement exposé. Les principaux instigateurs de cette réponse sont les cellules dendritiques et les lymphocytes, pouvant eux-mêmes être subdivisés en deux catégories, les cellules B et les cellules T (Hoebe *et al.*, 2004). Cette catégorie de globules blancs doit différencier les cellules saines du corps humain des cellules infectées ou encore des pathogènes, afin de dicter leur élimination. (Hoebe *et al.*, 2004). Pour ce faire, ils expriment des complexes protéiques de présentations d'antigènes appelés «complexe majeur d'histocompatibilité» (MHC) (Chaplin, 2010). Les différents peptides ainsi exposés aux autres cellules grâce à ces complexes seront vérifiés quant à leur provenance, soit endogène ou exogène. Les cellules phagocytaires recrutées pourront ensuite éliminer les cellules présentant les antigènes inconnus ou représentant une menace pour l'organisme. Elles garderont cette reconnaissance afin d'organiser une nouvelle réponse immunitaire si l'organisme se retrouvait en présence de ce même antigène dans le future.

1.2.2.1 Les signaux d'avertissement

Il existe deux grands types de signaux dictant à l'organisme qu'il doit réagir. D'abord, les «Pathogen-Associated Molecular Patterns» (PAMPs) sont des signaux d'avertissement contre les molécules exogènes. Sont inclus dans cette catégorie tous les produits bactériens, viraux et protozoaires tels que leurs protéines, lipides et acide nucléique (Ransohoff et Brown, 2012). Ensuite, il y a les «Damage Associated Molecular Patterns» (DAMPs), qui sont des signaux de danger caractérisés par les molécules endogènes. On les appelle également «alarmines» et sont libérés lors d'une mort cellulaire par nécrose puisque le contenu intracellulaire se retrouve dans l'environnement extracellulaire. Parmi ces molécules se retrouvent l'acide hyaluronique, la mitochondrie, l'ADN/ARN, les «Heat Shock Proteins» (HSP) et la protéine HMGB1 (Bianchi, 2007; Gesuete *et al.*, 2014).

1.2.2.2 Récepteurs impliqués

Ce sont les «Pattern Recognition Receptors» (PRRs) qui reconnaîtront les molécules signalant un pathogène ou encore un dommage. Les cellules exprimant ces récepteurs s'activeront et engendreront un signal en réponse à l'attaque microbienne ou au tissu endommagé. La principale famille de PRRs se nomme les «Toll-like receptors» (TLRs), il existe également d'autres récepteurs, dont les «Nod-Like Receptors» (NLRs), les «C-type Lectin Receptors» (CLRs) et les «RIG-I-like Receptors» (RLRs). Ils sont exprimés par la plupart des cellules du SNC, dont les microglies, les neurones, les astrocytes et les leucocytes et l'activation de ces récepteurs régulera la réponse immunitaire. Le tableau 1.1 résume quelques types de récepteurs, quelles cellules les expriment et à quels signaux ils réagissent (Błach-Olszewska, 2005). Ceci étant dit, les TLRs jouent un rôle important dans les maladies touchant le système nerveux central telle que la MA, puisque ce sont les récepteurs à la première ligne de défense immunitaire du cerveau. Leur expression est abondante et diversifiée chez les cellules gliales, précisément chez les microglies et astrocytes (Cameron et Landreth, 2010;

Trudler *et al.*, 2010). D'ailleurs, les TLR -1 à -9 sont exprimés par ces 2 types cellulaires et le tableau 1.2 résume les ligands à qui ils réagissent (Mogensen, 2009)

Tableau 1.1 Différents récepteurs impliqués dans l'immunité innée.L'expression de ces récepteurs varie selon le type cellulaire. Ces derniers peuvent être activés par des molécules exogènes provenant de pathogènes (PAMPs) ou bien par des molécules endogènes libérées lors d'une lésion tissulaire (DAMPs)

Récepteurs	Expression	Ligands	Fonctions
Toll-Like récepteurs (TLRs)	Monocytes macrophages , cellules dendritiques, neutrophils, ellules épithéliales	LPS, ADN, lipoprotéines, peptidoglican, virus	Défense bactérienne et virale, phagocytose
Mannose récepteurs	Macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales hépatiques	Carbohydrates des ADN et ARN de virus	Phagocytose, clairance des cellule apoptotique
Scavengers récepteurs	Macrophages, cellules dendritiques, cellules du muscle lisse	LTA, LDL	Phogocytose et clairance de bactéries
NK récepteurs	Cellules NK, macrophages	Inconnu	Activitée anti-tumeur et anti-virale

Tableau 2.2 Différents TLRs impliqués dans l'immunité innée.Les TLRs 1 à 9 sont exprimés par les microglies et astrocytes du SNC

Type de TLRs	Expression	Ligands
TLR-1	Surface cellulaire	Lipopetides bactérien
TLR-2	Surface cellulaire	A β , HMGB1, bactérie gram +, peptidoglycan, lipopeptide
TLR-3	Surface cellulaire/endosome	ARN simple et double brin de virus
TLR-4	Surface cellulaire	A β , HMGB-1, bactérie gram -, LPS, fibronectin
TLR-5	Surface cellulaire	Flagelline de bactéries
TLR-6	Surface cellulaire	Lipopetide diacyl, acide lipoteichoique
TLR-7	Endosome	ARN de virus
TLR-8	Endosome	ARN de virus
TLR-9	Endosome	ADN de bactéries, motifs CpG d'ADN bactérien ou de virus

1.2.3 Leucocytes

Les leucocytes, communément appelés globules blancs, sont pour l'organisme le moyen de défense par excellence. Ils sont produits dans les cellules souches de la moelle osseuse et circulent à travers le flux sanguin et le système lymphatique. On distingue parmi ces cellules entre autres les granulocytes, les lymphocytes et les monocytes (Chaplin, 2010). Puisque la signalisation via l'immunité innée est la plus impliquée dans les processus liés à la MA et que sa majeure composante est les monocytes, ces derniers jouent un rôle capital dans la progression de la maladie et de la pathologie amyloïde (Thériault *et al.*, 2015). Ils régulent les débris cellulaires directement dans le système périphérique et indirectement via leur différenciation le système nerveux central.

1.2.3.1 Monocytes

Les monocytes, un type de leucocytes dérivés des cellules hématopoïétiques, jouent un rôle crucial dans un contexte de MA. Ils peuvent se différencier par l'expression de 3 antigènes de surface (CD45, CD11b et CD115) et se subdivise en deux grandes catégories: patrouilleurs, caractérisés par les marqueurs CX3CR1^{high}, CCR2⁻ et Ly6C^{low} et inflammatoires, caractérisés par les marqueurs CX3CR1^{low}, CCR2⁺ et Ly6C^{high} (Geissmann *et al.*, 2003). D'abord, les monocytes patrouilleurs circulent le long des tissus vasculaires cérébraux et régulent la réparation tissulaire de même que les niveaux d'Aβ à l'intérieur des veines, acheminant les peptides pour éventuellement les éliminer (Michaud *et al.*, 2013a; Thériault *et al.*, 2015). Ces cellules furent démontrées comme indispensables chez des modèles murins de la MA, puisque lorsqu'elles sont appauvries, les niveaux d'Aβ se voit augmentés dans le cortex et l'hippocampe (Michaud *et al.*, 2013a) et une amplification de la mort neuronale est observée (Bellavance *et al.*, 2015). Ensuite, les monocytes inflammatoires infiltrent les tissus enflammés de nombreux organes, incluant le cerveau, pour éventuellement se différencier en macrophage (dans la périphérie) ou microglie (dans le CNS) (Ginhoux et Jung, 2014). L'attraction de ces cellules au site désiré ce fait

principalement via le récepteur C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) en reconnaissance de la protéine MCP1 (Deshmane *et al.*, 2009).

1.3 Système nerveux central

Le système nerveux central (SNC), composé de cellules neuronales dans le cerveau ainsi que de la moelle osseuse, est essentiel pour la survie de l'organisme (Carson *et al.*, 2006). Il est considéré, grâce entre autres à la barrière hématoencéphalique, comme un environnement « immunoprivilégié » où les réponses immunitaires adaptatives et inflammatoires sont hautement contrôlées. Ce mécanisme de régulations vise à limiter les perturbations homéostatiques et les dommages collatéraux (ex.: mort neuronale) (Harris *et al.*, 2014). Grâce à sa composition cellulaire, il assure un nombre incalculable de processus physiologique, dont le fonctionnement cognitif et mémoriel, qui est tel que mentionné précédemment le plus affecté chez les patients Alzheimer.

1.3.1 Barrière hématoencéphalique

La barrière hématoencéphalique (BHE) pourvoit le cerveau de même que le liquide cébrospinal d'une protection à la fois anatomique et physiologique de la circulation sanguine périphérique (Pachter *et al.*, 2003). Grâce à aux cellules endothéliales (principale composante de cette barrière) tapissant les capillaires du côté du flux sanguin, elle régule strictement l'entrée à l'intérieur du tissu nerveux de certaines substances du plasma et de certaines cellules véhiculées par le sang (ex.: leucocytes) (Lawther *et al.*, 2011). Chacune des cellules endothéliales est reliée par des protéines membranaires appelées « jonctions serrées » qui permettent l'adhésion entre les cellules et limitent le mélange du contenu des milieux intra- et extracellulaire (Pachter *et al.*, 2003; Lawther *et al.*, 2011). Grâce à la présence des jonctions serrées, les capillaires ne possèdent aucune fenestration et le transport vésiculaire est fortement réduit, ce qui confère une protection

contre les toxines, les pathogènes ou les hormones qui ne peuvent diffuser (Carson *et al.*, 2006). Des cellules qualifiées de semi-perméables (molécules liposolubles telles que l'O₂ et le CO₂) peuvent traverser librement alors que les nutriments tels que les vitamines et les acides aminés ou encore les déchets protéiques utilisent le transport actif via des protéines transmembranaires (Serlin *et al.*, 2015). En bref, la barrière hémato-encéphalique sert à protéger la diffusion libre des cellules, protéines, toxines et pathogènes, de même qu'en contrôler leur homéostasie.

1.3.2 Composition cellulaire

Les cellules endothéliales de la BHE, les neurones et les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglies) composent principalement le CNS.

1.3.2.1 Fonctionnement neuronal

Les neurones sont des cellules spécialisées responsables dans le SNC de la transmission d'informations. Grâce leur communication via des neurotransmetteurs et protéines, elle assure la mémoire, c'est-à-dire potentialisation à court (PCT) ou long terme (PLT). Brièvement, l'information visuelle, auditive ou sémantique qui est perçue génère des stimuli qui engendreront une connectivité synaptique (Kandel *et al.*, 2014). Le processus requiert une relâche du calcium (Ca²⁺) emmagasiné afin de générer une dépolarisation, une relâche subséquente de magnésium (Mg²⁺) et l'envoi d'influx nerveux. Ensuite, c'est le récepteur glutamate qui sera majoritairement utilisé pour la communication pré- et post-synaptique des neurones (Bliss et Collingridge, 1993).

1.3.2.1.1 Neurones affectés chez les patientes MA

En contexte Alzheimer, les neurones principalement affectés font partie du groupe des cellules pyramidales et du prosencéphale basal (Dong *et al.*, 2009). D'une part, les neurones cholinergiques situés près du striatum seraient les premiers touchés (Gu *et al.*, 2014). Ensuite, au stade à moyen/long terme, ce sont les cellules neuronales dites pyramidales, situées au cortex et dans l'hippocampe, qui seraient altérées (Berridge, 2013). L'information générée, sous forme de PLT (mémoire), est emmagasinée principalement dans l'hippocampe (Preston *et al.*, 2005). Les troubles de mémoires observés chez les patients sont ainsi expliqués par le fait que les cellules pyramidales font partie des plus affectés chez la MA. De plus, les neurones cholinergiques sont responsables de la majeure innervation du cortex et de l'hippocampe, et ont de ce fait un rôle dans l'attention et la mémoire (Mufson *et al.*, 2009). Étant elles aussi parmi les plus affligés en contexte Alzheimer, ceci explique les déficits cognitifs observés chez les patients.

1.3.2.2 Les cellules gliales

Ensuite, les cellules gliales, pour leur part, forment une unité fonctionnelle qui assure le bon fonctionnement des neurones, l'apport en nutriment de même que la défense de l'environnement (Iadecola, 2004).

1.3.2.2.1 Oligodendrocytes et astrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules dont le rôle est de pourvoir un support aux axones neuronaux. En fait, elle produit la gaine de myéline entourant les axones, destinée à la conductance du potentiel d'action (Liu et Zhou, 2013). Ensuite, les astrocytes servent pour leur part à contrôler l'homéostasie de certains ions (ex : potassium) et neurotransmetteurs (ex : glutamate), tout en régulant le flux sanguin

et l'activité/remodelage synaptique (Ransohoff et Brown, 2012). Elles ont également pour rôle de maintenir l'intégrité de la BHE et de fournir aux neurones les facteurs trophiques nécessaires à leur survie (Garwood *et al.*, 2013)

1.3.2.2.2 Microglies

Dans le cerveau, les microglies, représentant 10% des cellules du SNC, proviennent des macrophages primitifs durant le développement du cerveau et sont responsables majoritairement de la surveillance immunitaire du SNC (Solito et Sastre, 2012). Une fois infiltrées au cerveau, elles adoptent un phénotype hautement ramifié et patrouillent constamment les zones cérébrales, grâce au récepteur et son ligand CX3CL1 et CX3CR1 respectivement, à la recherche d'altérations (Elali et Rivest, 2015; El Khoury *et al.*, 2007).

Les microglies ont la capacité de s'activer rapidement en présence de lésions, adoptant une morphologie plus amiboïde (Elali et Rivest, 2015). Elles permettent d'abord l'élimination de synapses inutiles ou des cellules neuronales en dégradation afin de nettoyer le milieu (Neher *et al.*, 2012). Elles sont ensuite responsables d'une partie de l'élimination de l'A β , régulant ainsi sa concentration (El Khoury *et al.*, 2007). Effectivement, elles furent démontrées comme étant en étroite association avec les plaques d'A β et responsable du ralentissement de la MA en éliminant ce peptide (Rivest, 2009). Elles expriment tout le répertoire des TLRs et recrutent lorsque nécessaire la protéine adaptatrice MyD88 (voie pour tous les TLRs excepté TLR3) ou bien la voie recrutant TRIF (TLR3, TLR4) pour enclencher leur réponse immunitaire face à différents signaux environnants (**Figure 1.6**) (Aderem et Ulevitch, 2000; Manavalan *et al.*, 2011). Il en résultera en l'activation des facteurs de transcription NF κ B, ou AP-1, ou encore IRF3. Ultimement, il y aura une production accrue des molécules pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β . Un relâche d'oxyde nitrique, de métalloprotéinases, de radicaux libres ou encore de facteurs immunosuppresseurs peut aussi s'orchestrer (ex.: TGF β 1, IL-4 et IL-10) (Heneka, 2006; Mogensen, 2009).

On dénote chez un cerveau âgé plusieurs changements morphologiques, de même qu'une hyperactivité aux stimuli environnants, entraînant une production basale accrue des molécules inflammatoires précédemment citées (Solito et Sastre, 2012). En d'autres termes, elles deviennent progressivement dysfonctionnelles avec l'âge.

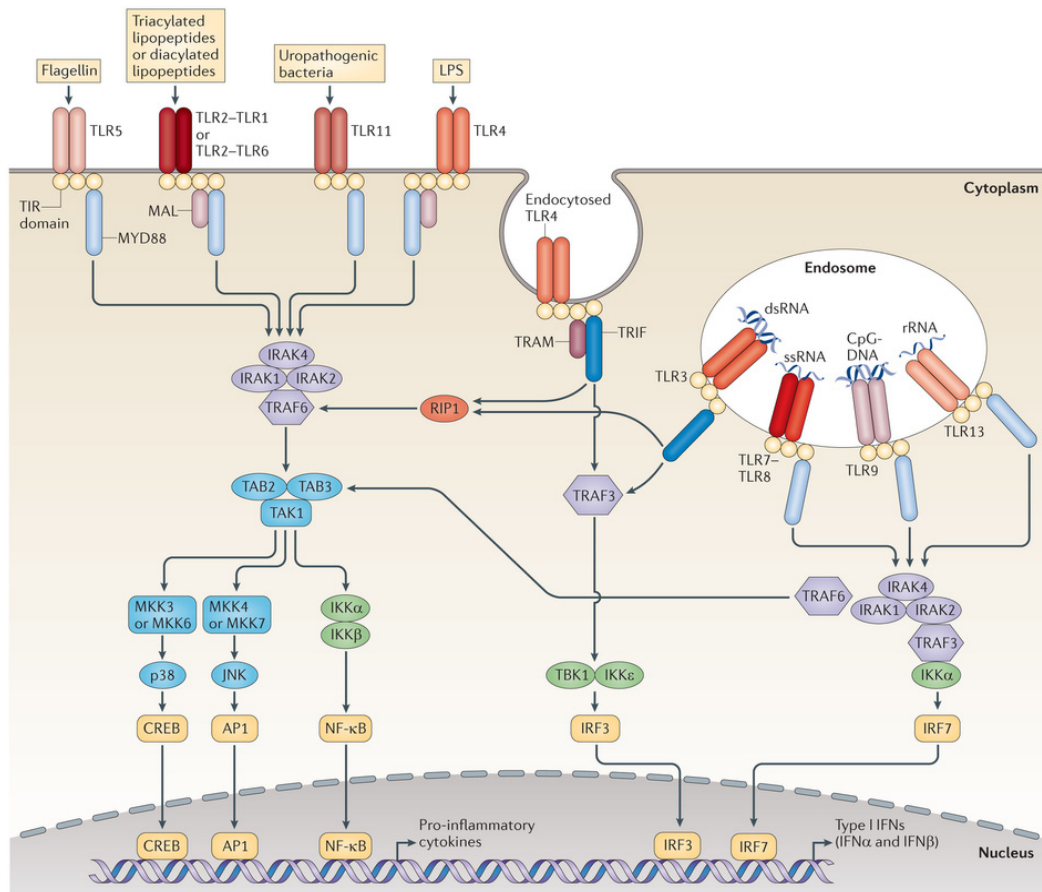


Figure 1.6 Signalisation des voies TLRs. Les récepteurs sont activés via différents signaux et s'ensuivra le recrutement de la protéine MyD88 ou TRIF. Ultiment, il y aura une production de molécules pro-inflammatoire. Tiré de O'Neill et al., 2013, Nature Rev. Immunol

1.4 Accumulation de l'amyloïde-bêta

1.4.1 Agrégation de l'A β

Tel que mentionné précédemment, l'A β est généré du clivage de l'APP générant des fragments de taille différente. Il constitue un mélange très hétérogène, puisqu'il se retrouve d'une longueur variant entre 37 et 43 nucléotides, dépendamment de la position clivée par la protéase, et sous différentes formes d'assemblages (monomères, oligomères et fibrilles) (Palop et Mucke, 2010). C'est le peptide terminant au 40^e nucléotide (A β 40) qui est le plus abondant dans le cerveau (~80-90%), suivie par le 42 (A β 42, ~5-10%) (Murphy et LeVine, 2010). La forme seule du peptide, appelée monomère, est soluble et c'est son mauvais repliement ou son auto-agrégation qui cause la toxicité. Les peptides enchevêtrés auront davantage tendance à s'associer entre eux ou avec d'autres protéines, menant à la formation d'oligomères, qui à leur tour peuvent se transformer en fibrilles (qui inclut de feuillet β) et ultimement en dépôts sous forme de plaque (**Figure 1.7**; Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014). Plus précisément, l'A β 40 s'associe avec lui-même pour former un dimère ou tétramère, alors que l'A β 42 s'associe pour former jusqu'à des dodécamères (Bernstein *et al.*, 2009). Ce sont d'ailleurs ces dodécamères qui forment les noyaux des plaques amyloïdes (Bernstein *et al.*, 2009). De surcroît, les états solubles oligomériques et fibrillaires génèrent une toxicité neuronale jusqu'à 13 fois plus importante et dommageable que les formes monomériques, faisant du même coup de l'A β 42 la forme la plus toxique, étant donné le fait qu'elle est plus hydrophobe et se retrouve principalement dans la forme fibrillaire (Benilova *et al.*, 2012; Selkoe, 2001). Les dépôts sous forme de plaques de l'amyloïde sont pour leur part moins toxiques, mais pas à prendre à la légère pour autant. En effet, les neurones et les microglies sont affectés par les plaques environnantes, les premières démontrant une dystrophie des nérites et une perte synaptique alors que les secondes démontrant une activation aberrante (Bezprozvanny, 2009). Étant donné que la voie de la β -sécrétase forme directement le peptide neurotoxique, elle constitue une cible de choix à inhiber afin de prévenir la MA. Toutefois, ce n'est pas si simple. La suppression de la β -sécrétase réduit effectivement la

concentration d'A β , mais entraîne également de nombreux effets secondaires, tels que des déficits de guidance axonale, des anomalies de neurogénèse, des troubles de mémoire, etc. (Yan et Vassar, 2014). Il faut donc cibler d'autre moyen afin d'éliminer l'A β de l'organisme.

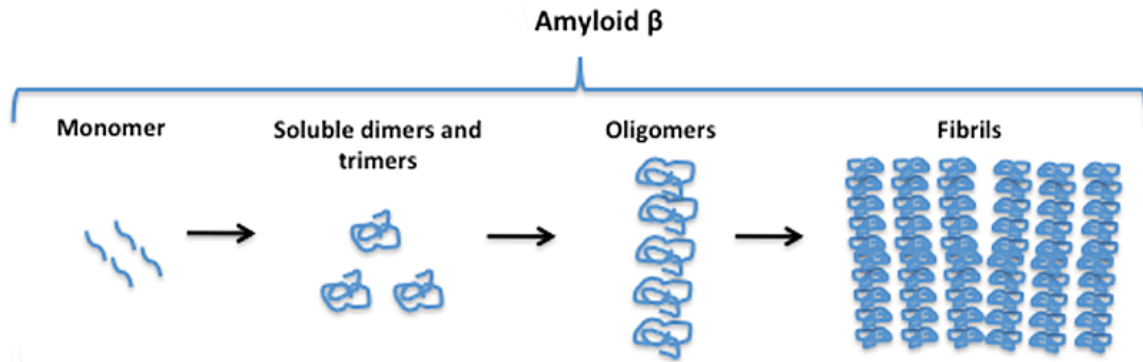


Figure 1.7 Différentes formes de l'A β . Représentation des monomères, dimères, oligomères et fibrilles de la protéine, menant ultimement aux dépôts sous forme de plaques. Tiré de Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014, Neurochemistry

1.4.2 Élimination

Il existe de nombreux mécanismes d'élimination de la protéine A β en conditions normales. Le peptide peut ainsi être dégradé via des voies utilisant l'autophagie ou des enzymes, ou encore être acheminé hors du CNS (**Figure 1.8**). D'abord, un des mécanismes primordiaux pour la survie neuronale est la production de vésicule lysosomale afin de dégrader des protéines endommagées ou mal repliées (Nixon et Dun-Sheng, 2012). De plus, la relâche de protéase telle que l'insuline-degrading enzyme (IDE), le neprilysin (NEP), l'angiotensin converting enzyme (ACE) ou des metalloproteinase (MMPs) servent à la dégradation protéolytique de l'A β (Morrone *et al.*, 2015; Yoon et Jo, 2012). Ensuite, l'A β peut être acheminé en provenance du CNS vers la périphérie. Les récepteurs low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) et apolipoprotéin (ApoE) jouent un rôle important dans l'homéostasie et le métabolisme de l'A β . Il permet aux cellules qui l'expriment de reconnaître l'A β et dans réguler leur phagocytose de même que son transport transendothéliale à travers la BHE (Kanekiyo et Bu, 2014).

Dans le même ordre d'idée, le receptor for advanced glycation end products (RAGE) est aussi associé à la consommation cellulaire de l'A β et son transport hors du SNC à travers la BHE (Sokolowski et Mandell, 2011). Une fois dans la périphérie, l'A β serait acheminé via la circulation sanguine pour être dégradé par les cellules hépatiques ou rénales (Bates *et al.*, 2009). Certaines évidences ont aussi été démontrées comme quoi les monocytes/macrophages provenant de la périphérie promouvaient la dégradation dudit peptide au cerveau (Michaud *et al.*, 2013a; Simard *et al.*, 2006).

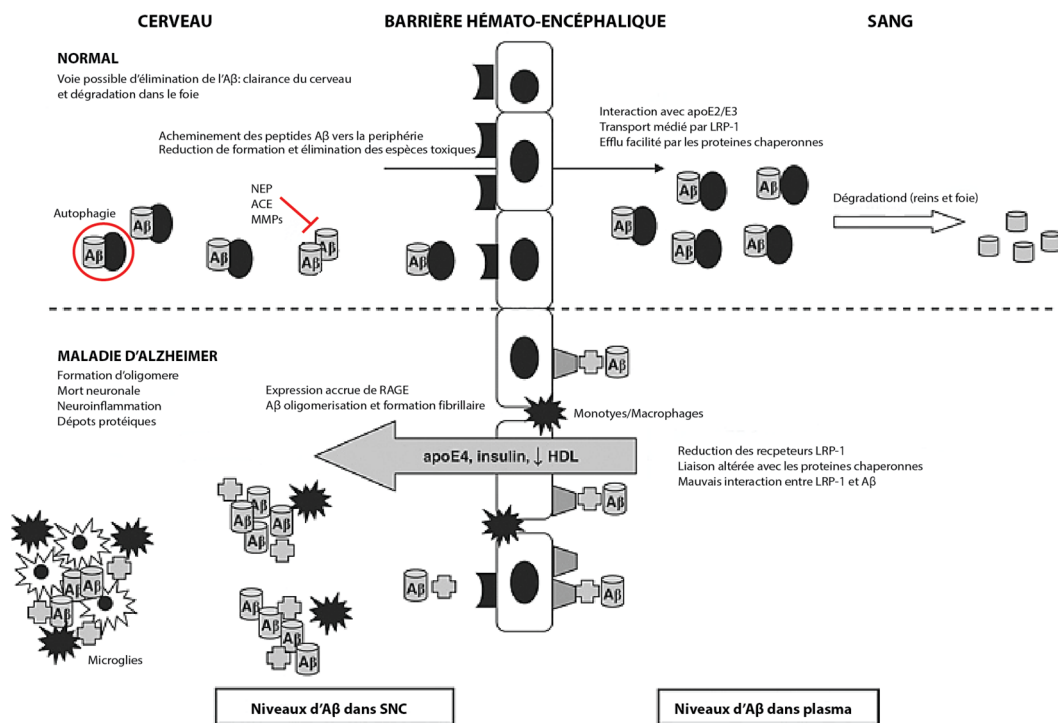


Figure 1.8 Mécanismes d'élimination de l'A β . Représentation des processus dans le cerveau et la périphérie en condition normale et en contexte Alzheimer. Adapté de Bates *et al.*, 2008, Molecular Psychiatry

1.4.3 Défaillance dans l'élimination

L'accumulation des niveaux protéiques augmentant en corrélation avec la condition pathologique suggère que les voies d'élimination de l'A β sont progressivement altérées. D'abord, la BHE devient beaucoup plus perméable avec l'âge, suggérant une diffusion

passive de l'A β , à son tour provoquant un surplus de stress oxydatifs et des changements vasculaires (Morrone *et al.*, 2015). Ensuite, la production d'enzymes dégradant l'A β est aussi diminuée avec l'âge. En fait, les ARNs messagers des protéines IDE, NEP et MMP9 décroissent avec l'âge (Caccamo *et al.*, 2005). Finalement, les cellules responsables du transport de l'A β hors du CNS ou de son élimination sont également moins efficaces avec le temps (Hickman *et al.*, 2008). Il est possible de croire que les fonctions de phagocytose des macrophages/microglies diminuent en corrélation avec la progression de la MA (Rivest, 2011). D'ailleurs, ces cellules ne transporteraient et n'élimineraient même plus l'a β à travers les endosomes et lysosomes, alors que la phagocytose des bactéries ne serait pas diminuée (Fiala *et al.*, 2007).

1.4.4 Activation microgliale en contexte MA

Les microglies sont les principales défenseuses du SNC. En ce qui a trait à l'A β , il active chroniquement les microglies, que ce soit en état soluble ou non. Certaines évidences attestent que les microglies sont attirées par les dépôts peptidiques, les encerclent et disposent de la capacité de les phagocyter (**Figure 1.9**) (Simard *et al.*, 2006 ; Sokolowski *et al.*, 2013). Elles sont activées par les dépôts d'A β via les TLRs 2 et/ou 4, provoquant la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF α et IL-6 (Heneka et O'Banion, 2007). Ce processus permettra de recruter d'autres cellules, internaliser l'A β et éventuellement l'éliminer (Tahara *et al.*, 2006). La défaillance en expression de ces deux récepteurs spécifiquement accélère la progression de la maladie, dénotant de leur importance capitale (Reed-Geaghan *et al.*, 2009; Udan *et al.*, 2008). Par exemple, la stimulation du TLR4 avec son agoniste dérivé du LPS, le monophosphoryl lipid A (MPL), améliore la pathologie amyloïde reliée à la MA — ce qui n'est pas observé avec le LPS — de par la diminution de la quantité d'A β (Michaud *et al.*, 2013b). Dans les mêmes ordres d'idées, des études sur la surproduction de molécules anti-inflammatoires telle que IL-10, où la pathologie de la MA se voyait exacerbée, appuient le rôle bénéfique de la réponse inflammatoire (Michaud et Rivest, 2015). Toutefois, tel que mentionné plus tôt, une surproduction de ces molécules inflammatoires peut éventuellement être nuisible pour le SNC. Une administration de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

chez des modèles animaux développant la MA supporte en partie le rôle que joue l'inflammation dans la progression de la pathologie amyloïde, puisqu'une réduction de plaques amyloïdes est observée avec les traitements utilisant des drogues AINS (Skokowa *et al.*, 2006). Aussi, l'inhibition de certaines cytokines pro-inflammatoire, par exemple l'IL-1 β , atténuerait la progression de la MA (Rivest, 2011). La conclusion reste donc controversée et peu claire: il serait primordial d'initier cette réponse inflammatoire afin de nettoyer l'A β , mais à long terme, cet environnement pro-inflammatoire empirerait la physiopathologie et les symptômes de la MA. Comme les AINS ont plusieurs cibles et par le fait même plusieurs mécanismes d'actions, des études approfondies sont nécessaires pour déterminer quelle voie de signalisation inflammatoire fait progresser la MA.

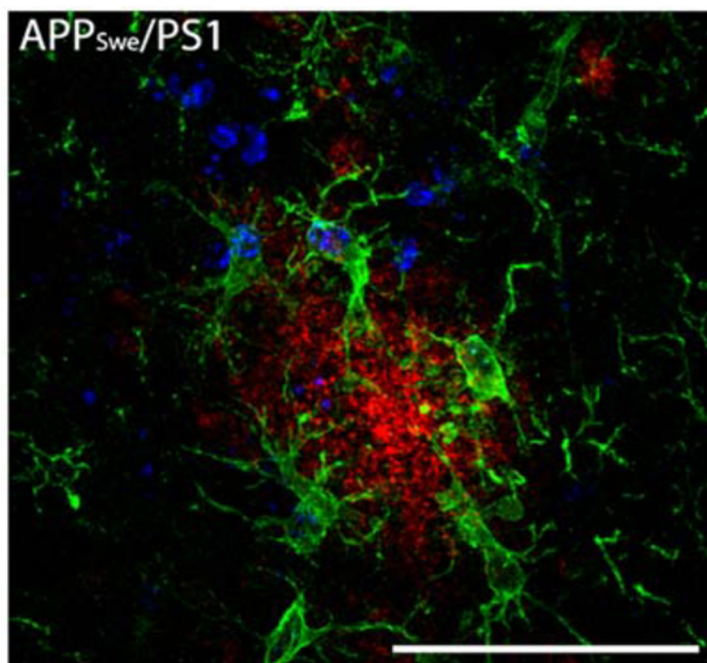


Figure 1.9 Migration des cellules microgliales vers l'A β . Co-localisation des microglies (vert) et de la protéine A β (rouge) chez une souris APP/PS1. Tirée de Simard *et al.*, 2006, Neuron

1.4.4.1 Mécanisme de phagocytose

Plusieurs protéines ont été ciblées afin d'expliquer le processus de phagocytose des microglies. D'abord, le récepteur triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2), exprimé par les monocytes, macrophages et microglie, agit comme

signal commandant les fonctions cellulaires en contexte de la MA (Rivest, 2015). Effectivement, grâce au recrutement de la protéine adaptatrice DAP12, le récepteur TREM2 module la phagocytose de l'A β ₁₋₄₂ et par le fait même réduit la neuroinflammation et la perte synaptique (Jiang *et al.*, 2014). Massivement exprimé chez le cerveau normal dans la matière blanche, l'hippocampe et le cortex, TREM2 est environ 10 fois plus présent chez les microglies comparées aux autres types cellulaires et est théoriquement muté et dysfonctionnel chez les patients atteints de MA (Boutajangout & Wisniewski, 2013; Melchior *et al.*, 2010). De façon similaire, le receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) peut lier l'A β et activer la cascade menant à son élimination (Lue *et al.*, 2001). En effet, la stimulation de RAGE par l'A β provoquerait une activation des microglies et par le fait même une relâche de molécules pro-inflammatoires afin d'éliminer le peptide (Deane *et al.*, 2015). L'expression de RAGE chez les astrocytes permettrait même la phagocytose de l'A β (Jones *et al.*, 2013). Finalement, le formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) servirait non seulement à la chemoattraction des microglies vers le peptide, mais aussi à son internalisation (Iribarren *et al.*, 2005)

1.4.5 Modèle murin

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour modéliser le plus fidèlement possible la MA et l'accumulation de l'A β . La majorité d'entre eux cible la pathologie amyloïde et un des modèles murins le plus utilisés est sans doute APP_{swe}/PS1. Caractérisé par l'expression des gènes humains APP et presenilin1 (PS1; protéine faisant partie du complexe protéique format la γ -sécrétase), ce modèle démontre une production et accumulation marquée de la protéine A β dans le parenchyme cérébrale (Webster *et al.*, 2014). Pour l'étude présentée dans ce mémoire, la mutation suédoise (swe) est utilisée sur le gène APP alors que le remplacement de l'acide aminé alanine par un glutamate (A246E) est utilisé sur le gène PS1 (Jankowsky *et al.*, 2004). Ce faisant, le peptide APP est non seulement produit en plus grande quantité, mais est aussi clivé plus abondamment dû au gain de fonction de PS1 (Dineley *et al.*, 2002). Décrit en détail pour la première fois par Borchelt *et al.* en

1996, ce type de souris génère la protéine humaine $A\beta_{1-42}$ préférentiellement, mais aussi de façon non négligeable l' $A\beta_{1-40}$ (Borchelt *et al.*, 1997). Les déficits cognitifs et psychomoteurs, de même que la formation des premières plaques, débutent dès l'âge de 3 mois (Zhong *et al.*, 2014). On dénote entre autres parmi ces déficits l'apprentissage spatial, la nidification, les réflexes et la locomotion (Filali *et al.*, 2009). Aussi, le recrutement microglial se fait grâce au récepteur CCR2. Par contre, ces modèles témoignent d'une faiblesse : ils échouent dans la génération significative de mort neuronal, et ce surtout en âge précoce du modèle animal (Foley *et al.*, 2015).

1.5 Excitotoxicité

Dans les cerveaux atteints de la MA, il s'orchestre un autre mécanisme contributif aux symptômes pathologiques: l'excitotoxicité. Défini comme un phénomène pathologique causé par une stimulation excessive des récepteurs neuronaux par le glutamate, l'excitotoxicité est responsable en partie de la mort neuronale (Danysz & Parsons, 2012). L'acide aminé glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant dans le cerveau et sa concentration synaptique et extracellulaire est hautement contrôlée. (Ong *et al.*, 2013). Il a pour rôle de transformer l'influx nerveux en stimuli chimiques et lorsqu'une défaillance survient chez l'un ou plusieurs des mécanismes de régulation, une quantité excessive de glutamate se retrouve dans le milieu synaptique et une mort neuronale s'ensuit (Revett *et al.*, 2013).

1.5.1 Mécanisme de mort neuronale

L' $A\beta$ est neurotoxique autant par sa liaison aux récepteurs neuronaux que par son activité sur les microglies et astrocytes entraînant une relâche excessive de molécules pro-inflammatoires et de stress oxydatifs. La mort neuronale chez les patients MA s'orchestre principalement chez les neurones cholinergiques, pour ensuite se répandre dans les zones cérébrales de l'hippocampe et du cortex (cellules pyramidales), là où la mémoire est majoritairement emmagasinée (Ong *et al.*, 2013).

1.5.1.1 Récepteurs impliqués

C'est principalement la liaison de l'A β aux récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NDMA), exprimés par tous les neurones, qui cause la neurodégénération (**Figure 1.10**). En effet, le peptide entraîne un dérèglement dans la consommation et relâche du neurotransmetteur glutamate et, subséquemment, un déséquilibre dans l'homéostasie calcique (Ca^{2+}) (Danysz et Parsons, 2012). Il en résulte conséquemment des pertes synaptiques et des dommages neuronaux. Ces derniers seraient causés vraisemblablement par l'interaction entre l'A β et le récepteur mGluR7 chez les neurones cholinergiques (Gu et al., 2014). Quant aux neurones pyramidaux, ils sont enrichies en récepteurs NMDA comparativement aux autres cellules du SNC, faisant d'eux une cible de choix pour l'excitotoxicité glutaminergique. De surcroît, l'A β , dû à la génération de dommages oxydatifs et son interaction avec le transporteur de glutamate GLT-1, empêcherait l'élimination du glutamate dans la fente synaptique normalement effectuée par les astrocytes. (Matos *et al.*, 2008).

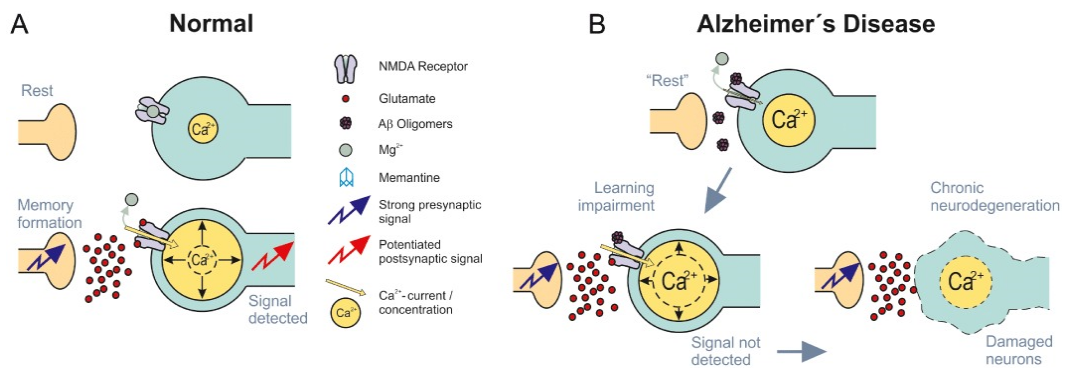


Figure 1.10 Voies d'excitotoxicité causé par l'A β . Le glutamate (points rouges) n'est pas recyclé normalement par les récepteurs NMDA (magenta) en contexte Alzheimer. L'A β (points noirs) active excessivement ces récepteurs, ce qui entraîne un dérèglement dans la cascade du calcique (jaune) et ultimement une mort neuronale. Tirée de Danysz, and Parsons, 2012, British Journal of pharmacology

1.5.1.2 Réponse à la mort neuronale

Tel qu'expliqué précédemment, lorsque l'A β est présent en grande quantité dans le milieu, une réaction de mort neuronale par nécrose s'ensuit. Se produit par le fait même une relâche du contenu cellulaire endogène (sigaux DAMPs) dans le milieu extracellulaire (Cameron et Landreth, 2010). Les microglies sont les premières cellules répondant à ce stress au site de lésion, principalement grâce à leur récepteur TLR2 (Liu *et al.*, 2012). Leur rôle est de nettoyer les corps cellulaires en dégénérescence et le récepteur stabilin-1 (STAB1) régulerait leur état phagocytaire par la reconnaissance de signal apoptotique phosphatidylserine (PS) (Park *et al.*, 2009). Leur réponse engendrera toutefois une importante relâche de molécules pro-inflammatoires, qui ultimement seront nocives pour les autres microglies ou neurones avoisinants (Jiang *et al.*, 2014). D'ailleurs, retirer les cellules microgliales dans un contexte Alzheimer préviendrait l'accroissement de la mort neuronale (Spangenberg *et al.*, 2016). De surcroît, l'A β lui-même suractive les microglies et les astrocytes, ce qui engendre une relâche excessive de glutamate, contribuant à l'excitotoxicité neuronale (Barger et Basile, 2001; Fernandez-Tome *et al.*, 2004). Une quantité exagérée de glutamate dérégulera également l'élimination de l'A β , puisque le récepteur NMDA coopérerait dans l'internalisation de l'amyloïde (Bi *et al.*, 2002)

1.5.2 Acide kaïnique

Afin d'étudier les effets de l'excitotoxicité (représenté par la mort neuronale) dans les modèles murins d'Alzheimer, l'injection d'acide kaïnique (KA) est utilisée (Gosselin *et al.*, 2013). En effet, le KA est un analogue conformationnel du glutamate qui agit sur une autre classe de récepteur impliqué dans la neurotransmission excitatrice, les récepteurs Kaïnate (KARs) (Wang *et al.*, 2011). Ces récepteurs, qui agissent pré- et post-synaptique, ont pour but de réguler la transmission synaptique en modulant le seuil d'excitabilité des

neurones (Lerma et Marques, 2013). La liaison du KA au KARs des neurones et microglies entraîne un influx rapide de calcium et une élévation marquée de sa concentration, une production d'espèce réactive à l'oxygène, un dysfonctionnement mitochondrial et une fragmentation de l'ADN (Zheng *et al.*, 2011). Ultimement, il en résulte en une mort neuronale qui est observée principalement dans la zone d'injection, soit le striatum. Le KA étant une substance qui diffuse de façon passive, donc relativement bien dans le CNS, de la mort neuronale est également observée dans l'hippocampe, le cortex, le striatum, l'amygdale et le cervelet (Liu *et al.*, 2012; Bellavance *et al.*, 2015). D'ailleurs, le KA est une substance perméable à la BHE, ce qui laisse croire qu'il pourrait induire de la mort neuronale et avoir un effet sur système nerveux périphérique (Gynther *et al.*, 2015)

1.6 Hypothèse et objectifs de recherche

Il y a un lien direct entre la mort neuronale, la réponse inflammatoire et la réponse immunitaire. Comme certaines de ces cellules immunitaires ont pour rôle d'éliminer l'A β , et que le milieu devient neurotoxique, nous avons envisagé l'hypothèse suivante :

«La mort neuronale causée par un dommage excitotoxique accélérerait la pathologie amyloïde chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer»

Afin de vérifier cette hypothèse, trois objectifs furent poursuivis tout au long des expérimentations: d'abord, nous voulions caractériser l'impact de l'excitotoxicité glutamatergique sur l'évolution de la pathologie amyloïde et des déficits cognitifs. Ensuite, nous désirions évaluer l'effet de la mort neuronale sur le recrutement et la réponse des cellules immunitaires. Finalement, nous voulions déterminer l'état phagocytaire des microglies suite à la mort neuronale.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication en voie de soumission et sont décrits au chapitre 2.

2. Résultats de recherche

Excitotoxic Insult in Alzheimer's Disease Mouse Model Accelerates The Progression of The Disease

Yannick Tremblay^a, Marc-André Bellavance^a, Jean-philippe Michaud^a, Giulia Cisbani^a, Serge Rivest^{1a}

^aCHU de Québec Research Center and Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Laval University, 2705 Boulevard Laurier, Québec City, QC G1V 4G2, Canada.

Running title:

Corresponding author (¹):
Serge Rivest, Ph.D.
CHU de Québec Research Center,
2705, Laurier boulevard,
Québec, QC, G1V 4G2, Canada
Phone #: 1-418-654-2296
E-mail: serge.rivest@crchudequebec.ulaval.ca

Author contributions: Y.T., J.-P.M., M.-A.B. and S.R. designed research; Y.T., J.-P.M., M.-A.B. performed research; Y.T., G.C., J.-P.M., and M.-A.B. analyzed data; and Y.T., G.C. and S.R. wrote the paper

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: serge.rivest@crchul.ulaval.ca

2.1 Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause majeure de démence, et ce à travers le monde. Caractérisée par l'accumulation de la protéine amyloïde-bêta ($A\beta$) dans le parenchyme du cerveau, la maladie est présumée causée par la défaillance d'élimination de ce peptide neurotoxique. Un autre joueur crucial dans la progression de la maladie est l'excitotoxicité glutaminergique, défini comme une toxicité induite par l' $A\beta$ et causant une partie de la neurodégénérescence. L'interaction entre ces deux phénomènes pourrait contribuer aux déficits cognitifs associés à la MA. Cette étude investigate les effets de la mort neuronale à la suite d'un dommage excitotoxique sur les fonctions des monocytes et microglies, de même que la progression de la pathologie amyloïde. L'acide kainique (KA), un analogue conformationnel du glutamate, fut injecté dans le striatum de souris au génotype « wild type » (WT) ou transgénique reproduisant la MA (APP/PS1) de par la surproduction d' $A\beta$. L'injection cause une détérioration de la santé générale de l'animal, de même que des troubles cognitifs et comportementaux. Ceci est également représenté post-mortem par une mort neuronale dans le cortex et l'hippocampe de l'animal lésé. Cette mort des cellules neuronales est accompagnée par une augmentation de la réponse inflammatoire dans le cortex des souris WT exposée au KA, mais pas chez les souris APP/PS1. Au niveau périphérique, nous avons observé une diminution du nombre total de monocytes chez les souris MA. Fait considérable, le nombre de plaques et niveaux soluble d' $A\beta$ est augmenté après une lésion au KA chez les souris APP/PS1 comparativement à leur contrôle. Conséquemment avec la diminution des microglies, un nombre moins important de ces cellules immunitaires furent associées aux plaques. Ensemble, ces résultats suggèrent que les dommages excitotoxiques chez le modèle de souris Alzheimer déclenchent une accélération de la maladie, des déficits comportementaux et cognitifs plus importants, de même que des niveaux de la protéine toxique $A\beta$ plus élevé. Ceci serait probablement dû à l'impact de l'excitotoxine sur le système immunitaire et particulièrement sur l'appauvrissement de la quantité de microglies et monocytes. Par conséquent, l'élimination de l' $A\beta$ affectée par les neurones en dégénérescence provoque l'aggravation de la pathologie amyloïde.

Mots clés: amyloïde-bêta | mort neuronal | monocytes | microglies |

2.2 Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia worldwide. Characterized by the accumulation of amyloid beta ($A\beta$) in the brain, the disease is believed to be caused by a defective elimination of this neurotoxic peptide. Another substantial player for disease progression is glutamate excitotoxicity, defined as an excessive stimulation of glutamate receptors, leading to neuronal cell death. $A\beta$ itself can induce excitotoxicity and further contribute to neurodegeneration. The interplay of these two phenomena might be responsible of the cognitive deficits observed in AD. In this study, we investigated the effects of neuronal death following an excitotoxic insult on microglia and monocyte functions as well as on the progression of the amyloid pathology. Kainic acid (KA), a conformational analog of glutamate, was injected intrastrially in wild type or transgenic AD mice (APP/PS1) overproducing $A\beta$. The injections caused a general deterioration of the health of the mice as well as behavioural and cognitive deficits. This is reflected post-mortem by neuronal loss in the cortex and hippocampus of the lesioned mice. Neuronal cell death is accompanied by an increased inflammatory response in the cortex of wild type mice exposed to KA but not in APP/PS1 mice. Peripherally, we observed a decrease in the total number of monocytes in AD mice. Importantly, the number of $A\beta$ plaques and soluble $A\beta$ is increased in KA-lesioned APP/PS1 mice compared to their sham. Consistently with the decrease of microglia, a smaller number of immune cells was associated with the plaques. Taken together, these results suggest that excitotoxic insult in an AD mouse model triggers an acceleration of the disease with the behavioural and cognitive impairments as well as an increment in the levels of the toxic protein $A\beta$. Likely, these is due to the impact of the excitotoxin on the immune system and in particular on the decreased levels of microglial cells as well as monocytes Thus, the clearance of the $A\beta$ is impaired, resulting in the worsening of the amyloid pathology.

Keywords: amyloid-beta | neuronal death | monocytes | microglia |

2.3 Introduction

Alzheimer disease (AD) is the leading cause of dementia worldwide and its incidence is considerably increasing with the aging of the population. Still incurable, hallmarks of the disease are the deposition of the neurotoxic peptide amyloid β ($A\beta$) in senile plaques, the formation of neurofibrillary tangles, extensive neuronal loss and dysfunctional synaptic connections in various cerebral areas such as the hippocampus and the cortex as well as a major inflammatory response (Dong *et al.*, 2009). Thus, the pathophysiology of AD is very complex and several different mechanisms might be implicated with the disease.

The amyloid cascade hypothesis, among all hypotheses, is widely accepted to be an initiator factor of the pathology. Described as an impaired elimination of the neurotoxic peptide $A\beta$, it results in the overproduction and the extracellular accumulation of $A\beta$ and the formation of senile plaques (Karran *et al.*, 2011; Querfurth and LaFerla, 2010). The $A\beta$ peptide is produced mainly in neurons following the subsequent cleavage of the Amyloid Protein Precursor (APP) by enzymes β -secretase (BACE 1) et γ -secretase, generating different isoforms of various length, ranging between 37 and 43 amino acids (Wildsmith *et al.*, 2013). $A\beta_{1-40}$ is the most abundant in the brain (~80-90%), followed by $4A\beta_{1-42}$ (~5-10%) (Murphy and LeVine, 2010). However, $A\beta_{1-42}$ is the most toxic and consequently, it has a determinant role in the evolution of the disease (Querfuth and LaFerla, 2010). The protein can be found in different conformational state (monomeric, oligomeric, fibrillars) (Palop and Mucke, 2010). The monomeric form of $A\beta$ is soluble and its misfolding and auto-aggregation can cause toxicity. Actually, this process leads to oligomeric formation of $A\beta$ which in turn can lead to fibrillar formation, that includes β -sheet structure. Eventually, it can deposits into extracellular plaques (Cardenas-Aguayo *et al.*, 2014). These oligomeric and fibrillar states of $A\beta$, in soluble form, generate neuronal toxicity up to 13 times more damaging than monomer (Benilova *et al.*, 2012). The prevalent toxicity of $A\beta_{1-42}$ is explained by its hydrophobicity and its predominant fibrillar state (Selkoe, 2001). The plaques deposits are thought to be less toxic, however they could cause neuronal damage, leading to dystrophic neuritis and synaptic loss (Bezprozvanny, I. 2009). An unbalance between $A\beta$ production and elimination is responsible of the accumulation of the pathological protein. Likely, an impaired autophagy prevents the clearance of $A\beta$ in AD parenchyma (Nixon, 2007).

A cascade of detrimental events, such as inflammation and excitotoxicity might be triggered by the presence of plaques and contribute to the progression of the disease as well (Vincent and Mulle, 2009). Excitotoxicity is a pathological phenomenon that is caused by an excessive stimulation of glutamate receptors, leading to neuronal cell death (Danysz and Parsons, 2012). Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the brain and its synaptic and extracellular concentrations are strictly controlled. When a disruption of these mechanisms occurs, excessive amount of glutamate are released leading to neuronal death. Excitotoxicity can be enhanced by A β itself. Indeed, it was demonstrated that glutamatergic signalling is jeopardize by A β modulation of glutamate receptors in certain brain regions, in parallel to the progression of cognitive deficits (Parameshwaran *et al.*, 2008). Moreover, A β triggers activation of microglia cell, causing either an excessive release of glutamate or pro-inflammatory molecules release (Barger and Basile, 2001; Fernandez-Tome *et al.*, 2004)

Both these phenomena, the amyloid cascade and excitotoxicity, are believed to contribute to cognitive deficits and progression of AD. However, most of studies supporting the amyloid physiopathology use an AD mouse model, such as the APP/PS1, which show an important production and accumulation of A β in the brain, with the formation of plaques but without neurodegeneration. In this study, we aim to evaluate the effects of glutamate excitotoxicity, via intrastriatal injection of kainic acid (KA), in young APP/PS1 mice on A β homeostasis and immune cell response in AD context.

2.4 Material and Methods

2.4.1 Mice

49 APP^{swe}/PS1 transgenic mice [B6C3-Tg(APP695)3Dbo Tg(PSEN1)5Dbo/J] (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), maintained in a C57BL/6J background and 39 WT controls (C57BL/6J mice; The Jackson Laboratory) were housed and acclimated to standard laboratory conditions (12-hour light/dark cycle / lights on at 7:00 AM and off at 7:00 PM) with *ad libitum* access to chow and water. Only adult males were used aged between 2.5- and 3-month. All protocols were performed in accordance to the Canadian Council on Animal Care guidelines, as administered by the Laval University Animal Welfare Committee.

2.4.2 Kainic acid intracerebral injection

Mice were anesthetized with isoflurane and the site of injection was stereotaxically reached as described by Bellavance *et al.*, 2015. Briefly, 150 ng of kainic acid (KA) diluted in 1 μ l of sterile 0.9% saline was stereotaxically injected in the right striatum (coordinates from bregma: 0.5 mm antero-posterior, -2.0 mm lateral and -3.5 mm dorsoventral; Suppl. **Fig. 2.6**) over 2 min using a 10-ml gastight syringe (Hamilton, Reno, NV, USA) equipped with a 30-gauge needle and mounted on a UltraMicroPump II operated by a Micro4 microprocessor controller (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Age-matched control mice were injected with 1 μ l of saline vehicle. After each injection, a rest of 2 min was allowed before the needle was incrementally removed from the brain. The scalp was sutured and 1 μ l of warmed sterile 0.9% saline was administered. Animals were observed for up to 6 h.

2.4.3 Behavioral analyses

Mice were housed one per cage and tested during the “light on” phase of the day. The behavioral experimenter was blinded to both the genetic background and treatment status of the animals. The general health was monitored by evaluating the survival rate up to 30 days post-surgery and weight loss up to 8 days post-surgery. A battery of behavioural tests was carried during the early wake phase (evening) by the same investigator

2.4.3.1 Nesting behavior

Nesting behavior was evaluated daily, up to 8 days post-injection (dpi). A 5 \times 5 cm piece of cotton was introduced in each cage to allow nesting behaviour. One day later, the quality of the nest was determined according to a five-point scale as described by Deacon (Deacon, 2006): 0—No nest, 1—Nestlet apparently untouched (more than 90% intact), 2—Nestlet partially torn up, 3—Nestlet mainly shredded but no apparent presence of nesting site, 4—Observable flat nest, 5—Observable (near) perfect nest.

2.4.3.2 Water T-maze

To assess hippocampal-dependent spatial learning and memory, mice were trained in the water T-maze (WTM) 3 dpi as described by Michaud *et al.*, 2013. Basically, the T-maze apparatus (length of stem 64cm, length of arms 30 cm, width 12 cm, height of walls 16 cm) was made of clear fiberglass and filled with water ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) at a height of 12 cm. An escape platform (11 \times 11 cm) was placed at the end of the target arm and was submerged 0.5 cm

below the surface. The acquisition phase allows the assessment of APPswe/PS1 mice for left–right spatial learning. During the first two trials, platforms were placed on each arm of the WTM. To assess arm preferences, the least-chosen arm was reinforced by water escape. The mice were placed in the stem of the WTM and chose to swim either left or right until they found the submerged platform and escaped to it, for a maximum of 60 s. After reaching the platform, the mice were allowed to stay on it for 20 s and then were immediately placed back into the maze. If the animals did not find the platform within this time limit, they were gently guided onto it. Repeated trials were presented on the same day up to a maximum of 48 trials. A rest period of at least 10–15 min intervened between each block of 10 trials. A mouse was considered to have learned the task when it made no errors in a block of five consecutive trials. The reversal learning phase was then conducted 48 h later. During this phase, the same protocol was repeated except that the mice were trained to find the escape platform on the side opposite that they had learned during the acquisition phase. Repeated trials were presented on the same day up to a maximum of 24 trials. Two measures were taken: number of trials to reach the criterion (five of five correct choices made on consecutive trials) and escape latency. The experimenter was blind to the treatments, and all mice were distributed randomly. After 10 trials in the WTM, mice were dried and given a rest period to prevent hypothermia and fatigue

2.4.3.3 Neurological evaluation

Neurological score was evaluated using a modified Garcia's scale (Garcia et al. 1995) 5 dpi. 5 tests were evaluated and cipher for a total of 3 points for each test (maximum score of 15 overall): spontaneous activity, symmetry in the movement of four limbs, forepaw outstretching, climbing and body proprioception.

2.4.3.4 Rotarod

Rotarod performance was assessed 7 dpi. The acceleration was set at 0.3 rpm/s and the latency before falling from three trials (spaced by 5 min) was compiled. Animals were previously trained three times (2 trials per training session) during the week before surgery.

2.4.4 Flow Cytometry Analysis

Blood (about 100 μ L) was withdrawn 30 dpi. from the facial vein in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) coated vials (Sarstedt, Montréal, QC, Canada). Within 30 minutes, blood was

pipetted into polystyrene tubes (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada) and incubated 20 min on ice in presence of rat anti-mouse CD16/CD32 antibodies (clone 2.4G2, BD Biosciences) for non antigen specific binding. Cells were then stained for 40 minutes with the following antibodies: V500-conjugated rat anti-mouse CD45 (clone 30-F11; BD Biosciences), A700-conjugated rat anti-mouse CD11b (clone M1/70; eBioscience, San Diego, CA, USA), APC-conjugated rat anti-mouse CD115 (clone AFS98; eBioscience), V450-conjugated rat anti- mouse Ly6C (AL-21; BD Biosciences), and PE-conjugated rat anti-mouse Ly6G (clone 1A8; BD Biosciences). Red blood cells were lysed with BD Pharm Lyse (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Samples were washed with DPBS and acquired on a flow cytometer (BD LSR II, Mississauga, ON, Canada). Data were analysed with FlowJo software v10 (Tree Star; Ashland, OR, USA). Cell debris and doublets were excluded from the analysis

2.4.5 Tissue Collection.

Brains were collected at 3 or 30 dpi. Mice were deeply anesthetized via an i.p. injection of a mixture of ketamine hydrochloride (91 mg/ml) (Vetalar, Bioniche, Belleville, ON, Canada) and xylazine (9.1 mg/ml) (Rompun, Bayer, Toronto, ON, Canada) and then perfused intracardially with ice-cold 0.9% saline. Brains were rapidly removed from the skulls and placed in cold PBS solution. Brains were then either rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for protein analysis or postfixed for 2–4 days in 4% PFA (pH 7.4) at 4 °C and then placed in a PFA solution containing 10% sucrose overnight at 4 °C. These brains were mounted on a freezing-microtome (Leica), frozen and cut into 25- μ m coronal sections. The slices were collected in cold cryoprotectant solution (0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.3), 30% ethylene glycol, and 20% glycerol) and stored at -20 °C for *post mortem* analyses.

2.4.6 In situ hybridization

In situ hybridization (ISH) was performed in brain collected 3 dpi to evaluate mRNA levels of the genes *triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)*, *stabilin11 (STAB1)* and *TLR2* on brain slices using specific [³⁵S] UTP labeled cRNA probes. Details regarding these probes were published in Laflamme and Rivest, 2001. Plasmids were linearized and sense and antisense cRNA probes were synthesized with appropriate RNA polymerase. All plasmids were analysed for sequence confirmation and orientation. Riboprobe synthesis and preparation as well as *in situ* hybridization were performed according to a protocol described previously

(Laflamme et al., 1999; Laflamme et al., 2001). All images were acquired using a film (Kodak BioMax MR; Sigma-Aldrich) and a Northern Light desktop illuminator (Imaging Research, Ste-Catherine's, ON, Canada) where a camera system (Canon EOS Rebel T3 2013) was attached. The system was calibrated with a standard reference scale of 20 transmittance levels prior to measuring the optical density (OD) and area of positive hybridization signal of three brain slice (bregma -1.55, -1.91, and -2.27 mm) was acquired. Quantification was done by determining integrative OD of the slices using ImageJ software (version 1.48v, NIH, USA).

2.4.7 Histochemistry

2.4.7.1 Fluoro-Jade β (FJB) staining

To reveal degenerating neurons, 3 or 30 dpi free-floating brain sections were stained as previously described (Bellavance *et al.*, 2015). Briefly, brain sections were washed with 50 mM potassium phosphate-buffered saline (KPBS) (3 x 10 min) at room temperature (RT). Every 12th section was then mounted on Superfrost Plus slides (VWR, Radnor, PA, USA), dried and fixed in 4% PFA (pH 9.0) at 37°C for 2.5 h. After KPBS washes, the sections were dehydrated in crescent graded ethanol solutions (50%, 70% and 100%) and subsequently rehydrated in decrescent graded ethanol solutions (70%, 50%) and finally in distilled H₂O. Following immersion of the slides in a solution of permanganate potassium for 10 min and rinse in H₂O, the sections were stained with solution of FJB (Histochem, Jefferson, AR) 0.0004% and acetic acid 0.1% for 20 min. Stained tissues were finally rinsed in H₂O, dried overnight in the dark, dropped in xylene (3 x 3 min) and coverslipped with distyrene plasticizer xylene (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

2.4.7.2 Congo red

Staining of A β plaques was performed on 30 dpi free-floating sections incubated in a solution of 50% ethanol containing 0.5 % Congo red (Sigma-Aldrich) for 30 min at RT. Then, after washes in H₂O, they were dipped 10 times in a solution of 50% ethanol and 1% sodium hydroxyl (50 ml H₂O containing 1% m/v NaOH (Sigma-Aldrich)). Afterwards, sections were washed in H₂O and dehydrated in crescent graded ethanol solutions (50%, 95% and 100%). Finally, following rehydration by subsequent dips in 95% ethanol, 50% ethanol and KPBS, sections were mounted on Superfrost Plus slides (VWR, Radnor, PA, USA).

2.4.7.3 Immunohistochemistry

Staining of microglia was realized on 30 dpi free-floating brain sections. After washes in KPBS and incubation first in 3% peroxide for 30 min followed by blocking solution (4% goat serum, 1% bovine serum albumin, and 0.4% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in KPBS, sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody rabbit anti-mouse ionized calcium binding adaptor 1 (Iba-1) (1:2,000; Wako Chemicals, Richmond, VA, USA). Afterward, sections were revealed with secondary antibody goat anti-rabbit biotinylated 2 h at RT (1:1,000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) 1 h at RT. The peroxidase reaction using 2.5% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.01% H₂O₂ in KPBS was finally performed for 10 min at RT and the brains sections were mounted on Superfrost Plus slides (VWR, Radnor, PA, USA).

2.4.7.4 Immunohistochemistry and CongoRed Merged

Staining of microglia cells and A β plaques on the same brain slice was performed at 30 dpi by first doing the congored staining as described above and then the Iba-1 ABC peroxidase staining as described above

2.4.8 Western Blot analysis of brain sample

The extraction of protein from 30 dpi brain was performed on brain and on ice to minimize protein degradation. The brain was placed in a 1-mL syringe connected with a 20-gauge needle. After adding five hundred microliters of buffer (50 mM Tris·HCl (pH 7.6), 0.01% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, and protease inhibitor mixture (Roche)), the brain sample was passed 10 times through the needle to homogenize the tissue. Samples were then centrifuged for 10 min at 855 × g at 4 °C. The supernatant was then collected and the protein concentration was determined using the Quantipro BCA assay kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Proteins were separated on a precast 10–20% SDS polyacrylamide Tris-Tricine gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Separated proteins were then transferred onto PVDF membranes (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Blots were blocked in TBS (1 M Tris·HCl (pH 8.0), 5 M NaCl) with 5% skim milk, and 0.05% Tween 20 and probed with the following rabbit antibodies: anti-APP (22C11; eBiosciences) and anti-HMGB1 (ab18256; Abcam, Cambridge, UK). Blots were visualized using goat IgG anti-rabbit secondary antibodies tagged with horseradish peroxidase (Jackson

Immuno Research Laboratories, Inc.) by enhanced chemiluminescence detection system (GEHealthcare, Mississauga, ON, Canada) and exposed on BioMax® Kodak film (Sigma-Aldrich). Membranes were stripped in 25 mM glycine·HCl (pH 2.0) containing 1% SDS and probed as described above with anti- β -actin rabbit monoclonal antibody (13E5; Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA) to allow the revelation of loading controls. Quantification was done on digitized film with ImageJ software (version 1.48v, NIH, USA) by determining integrative density of the bands. Background values were removed and optical values were normalized according to the respective loading controls.

2.4.9 Elisa for soluble A β 40 and A β 42

Brain soluble A β 40 and A β 42 levels were quantified in 30 dpi brain extract using Human Amyloid β 40 and Human Amyloid β 42 Brain ELISA kits (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.4.10 Stereological Analyses and image acquisition

All quantitative analysis were performed blind to the experimental conditions. Stereological analyses of FJB-positive neurons, Congo Red plaques and microglia cells were performed on the ipsi- and contra-lateral cortex and hippocampus on three brain sections (bregma -1.58, -1.94, and -2.30 mm; **Suppl. Fig. 2.7**), where areas were traced as virtual overlay on the steamed images. The number of A β plaques, microglia cells and degenerating neurons in these regions were subsequently quantified using StereoInvestigator software package (version 5,65; MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA). Photomicrographs of brain sections stained with either Congo Red, Iba-1 or FJB were acquired with 10X (NA 0.45), 20X (NA 0.75) or 60X (NA 1.40 oil) Plan Apo objectives on a Nikon eclipse 80i microscope equipped with a Retiga camera using QImaging software (version 2.0.8, Surrey, BC, Canada). Same parameters were used for florescence and bright field image acquisition.

2.4.11 Statistical Analyses

Statistical analysis of the data was carried out with GraphPad Prism software (version 6.0a, San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences between groups were obtained with the unpaired student t-test for the levels of soluble A β in Elisa, the count of degenerating neurons and the count of plaques or microglia. The one-way ANOVA/Tukey test was used for behavioral analyses (neurological

score and rotarod performance) whereas the two-way ANOVA/Tukey tests were applied to identify differences between the groups in flow cytometry, western blot, ISH and the remaining behavioral values (weight loss, nesting score and t-water maze). The level of significance was set at 0.05. The p-value is described as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

2.4.12 Image preparation

All panels were assembled using Adobe Illustrator software (CS6, version 16.0.0, San Jose, CA, USA) and Adobe Photoshop software (CS6, version 13.0, San Jose, CA, USA)

2.5 Results

2.5.1 KA injection exacerbates cognitive impairment in AD context

Following intrastrial KA injection in WT and APP/PS1 mice, we first monitored the general health of the mice by evaluating their survival rate up to 30 days post-injections (dpi) and weight loss up to 8 dpi (**Figure 2.1A and B**). KA injection worsened the percentage of survival (**Figure 2.1A**) and lead to weight loss in APP mice significantly different compared to the sham ones ($p \leq 0.05$) or to the WT ones ($p \leq 0.0001$) (**Figure 2.1B**). We then investigated the behavior in the first week after KA exposition. Nesting behaviour was scored daily up to 7dpi. As expected, AD transgenic mice performed less well than WT ones (**Figure 2.1C**; $p \leq 0.0001$). Neurological functions were diminished as well (**Figure 2.1D**; $p \leq 0.0001$). Importantly, KA injections had also a substantial effect on the transgenic mice when compared to their counterparts. Additionally, APP/PS1 mice showed an accelerated cognitive impairment following KA injection in water T-maze test when compared to both saline-treated AD mice and KA-lesioned WT mice (**Figure 2.1F**; $p \leq 0.01$ & ≤ 0.05). Finally, motor coordination and balance were affected as well, as demonstrated by the rotarod test (**Figure 2.1E**; $p \leq 0.001$). Indeed, KA-exposed AD mice remained on the rotating platform for a shorter time compared to the sham mice or KA-lesioned WT mice. Taken together, these data suggest that the excitotoxic insult might cause greater learning, neurological and behavioral deficits in AD context than in normal conditions.

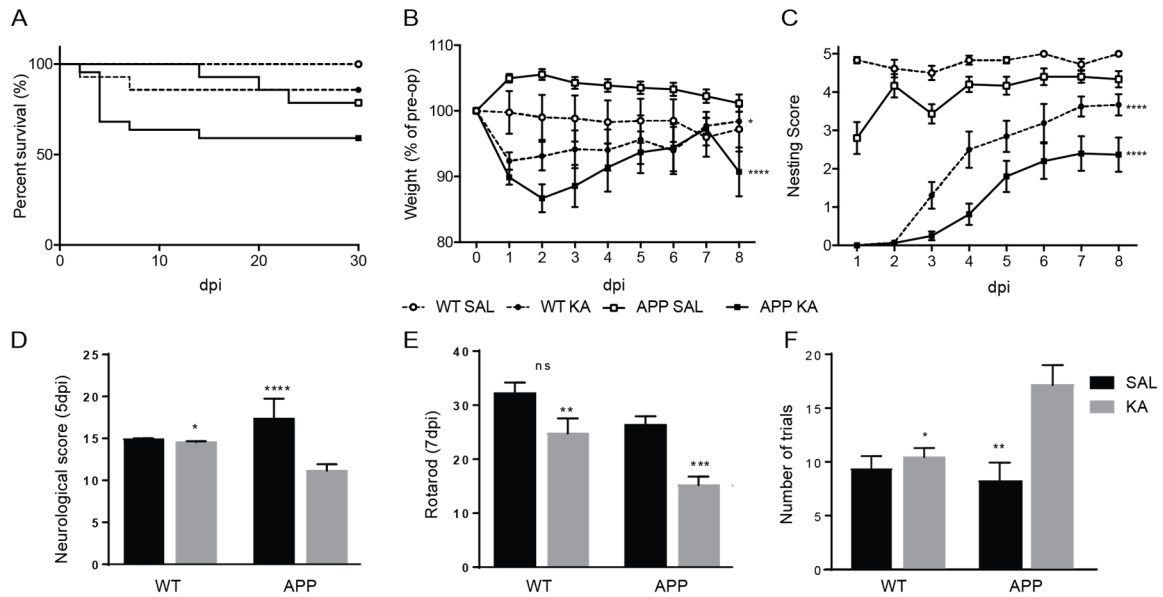


Figure 2.1. Kainic acid (KA) intra-atrial injections aggravate behavioral phenotype in APPswe/PS1 mice. The general health of the mice was evaluated by recording survival rate (A) as well as weight loss (B), nesting performance (C) and neurological score (D) of APPswe/PS1 or wild type (WT) mice that received an intra-atrial injection of KA or saline (SAL) over a period of 30, 8 and 5 days post-injection (dpi) respectively. (E) Rotarod performance at 7 dpi and (F) T water maze behavioral test at 10 dpi was utilized to evaluate motor behaviour and spatial learning and memory. Data are expressed as mean \pm SEM (n= 9-12 mice per group). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (D, E), or two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (B, C and F). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 comparing WT-KA or APP-SAL to APP-KA. Abbreviations: APP: APP/PS1 mice; dpi: days post-injections; KA: Kainic acid; SAL: saline; WT: wild type.

2.5.2 Neuronal death is aggravated by excitotoxic insult in AD mice.

Following KA exposition, we evaluated neuronal cell death in discrete brain regions across the antero-posterior axes at 3 dpi, peak of degeneration (Bellavance *et al.*, 2015) and at 30 dpi, to assess the long-term effects of the excitotoxic insult in AD. Neuronal loss, identified with fluoro-jade (FJB) staining, was significantly higher in APP/PS1 mice at 3 dpi compared to WT mice (Fig. 2.2A; $p \leq 0.05$). Neuronal cell loss was also sustained at 30 dpi although the percentage of degeneration was lower than at earlier times (Fig. 2.2B; $p \leq 0.05$). Virtually, no neuronal death was observed in the sham mice. These observations suggest that an impaired immune response could determine a deficit in the neuronal debris clearance and/or an aggravation of the neuronal loss.

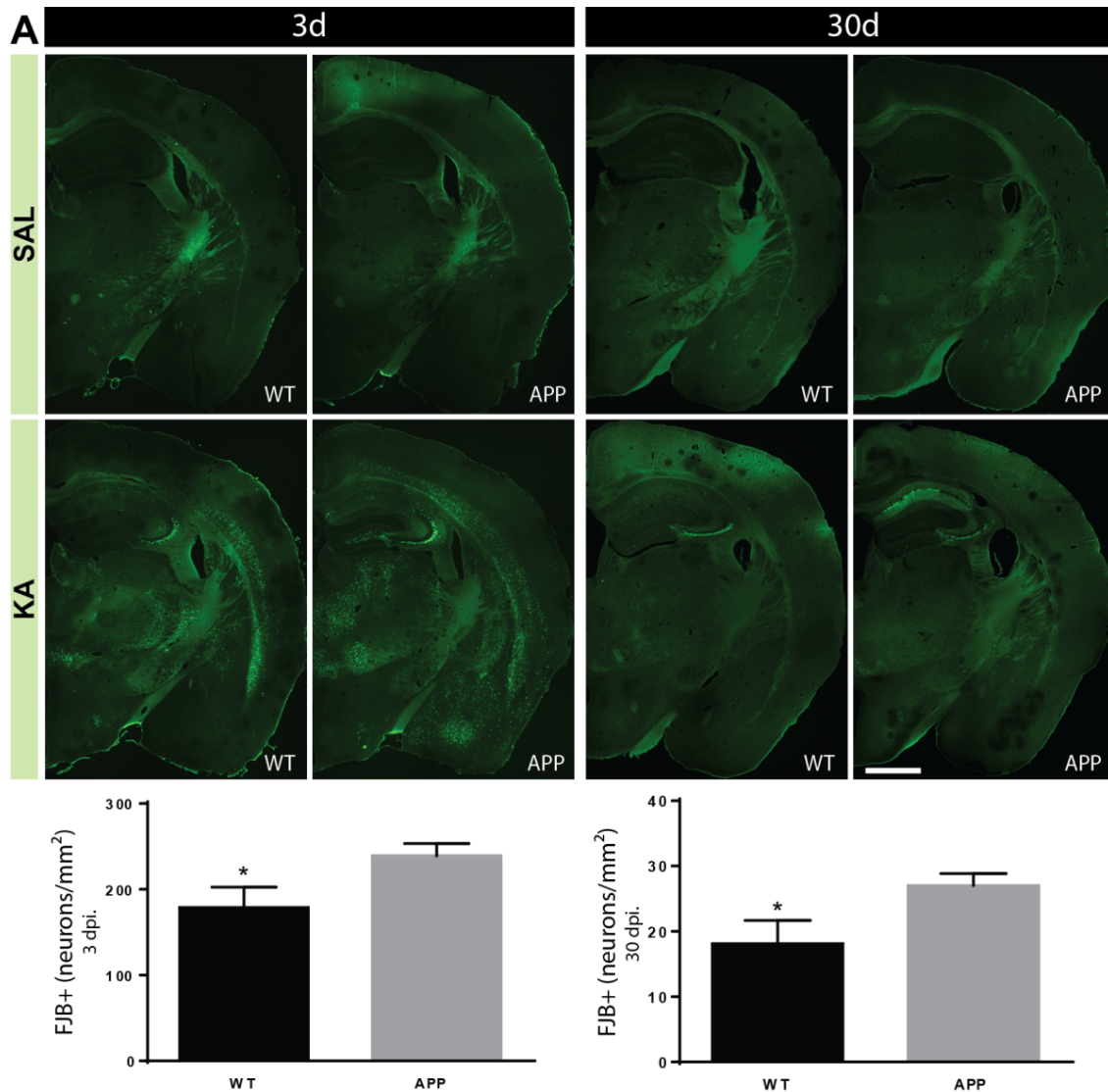


Figure 2.2. Neuronal death is exacerbated in APP_{sw}/PS1 mice following KA injection. (A) Representative images of coronal brain sections from APP_{sw}/PS1 or WT mice that received an intrastriatal injection of KA or saline stained with fluoro jade β (FJB+) at 3 and 30 dpi. Stereological quantifications of FJB+ degenerating neurons at 3 and 30 dpi. Scale bar: A: 62.5 μ m. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 8 mice per group). Statistical analyses were performed by unpaired t-test. * p < 0.05 comparing SAL to the KA lesioned APP_{sw}/PS1 group. Abbreviations: APP: APP/PS1 mice; dpi: days post-injections; FJB: fluorojade B; KA: Kainic acid; SAL: saline; WT: wild type.

2.5.3 KA lesions affect the peripheral and central immune system

To validate our hypothesis, we next evaluated the impact of the excitotoxin on the immune response dissecting the contribution of the peripheral circulating cells as well as microglia cells in the parenchyma at 30 dpi. As previously shown by Bellavance *et al.* in 2015, circulating levels of monocytes are affected by the intraparenchymal injection of KA. In our study, we observed the reduction of the overall number of monocytes as well as the number of the inflammatory and patrolling ones in KA-lesioned AD mice compared to their WT counterparts (Fig. 2.3; $p \leq$

0.01). The decrease in patrolling monocytes might compromise significantly neuronal survival. In the parenchyma, immune response was also affected 30 dpi. Iba-1 positive microglia cells (Fig. 2.4) were counted in the hippocampus and cortex, targeted regions in AD, and where neuronal death was mostly observed. However, microglial response was distinctively lower in the cortex of AD mice compared to their WT analogue (Fig. 2.4C-D; $p \leq 0.05$) while this difference was not observed in the hippocampus. These observations suggest that microglia motility and recruitment was impaired after KA lesion and it is persistent at 30 dpi.

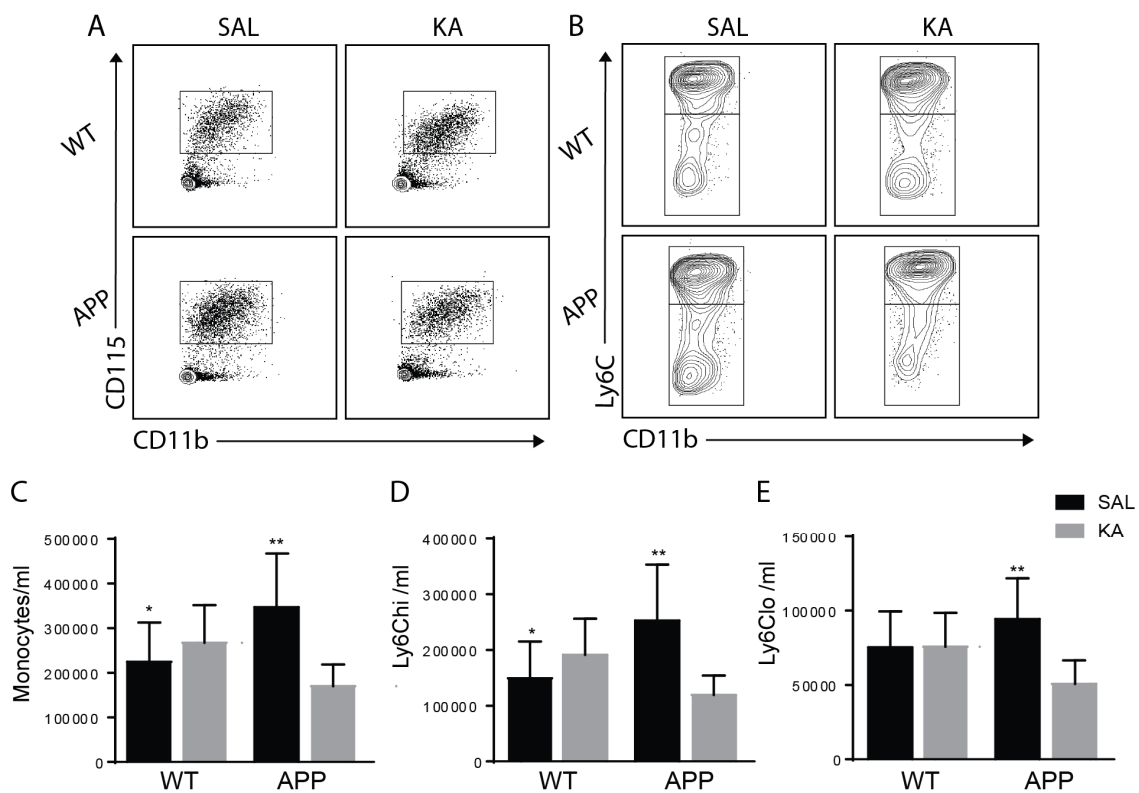


Figure 2.3. Decreased levels of monocytes following intrastriatal KA administration in APP/PS1 mice. Blood levels of leukocytes were evaluated by flow cytometry in vehicle (sterile saline) and KA-administered WT and APP mice. (A) Representative graph plots of the gating strategy to identify total monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/CD115⁺) and (B) inflammatory or patrolling monocytes (Ly6C^{high} or Ly6C^{low}). Total number of monocytes (C) as well as Ly6C^{high} (D) and Ly6C^{low} (E) subsets in relation to ml of blood. Data are expressed as mean ± SEM (n = 9-12 mice per group). Statistical analyses were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (treatment). * p < 0.05, ** p < 0.01 comparing WT-SAL to WT-KA or APP-SAL to APP-KA. Abbreviations: APP: APP/PS1 mice; KA: Kainic acid; SAL: saline; WT: wild type.

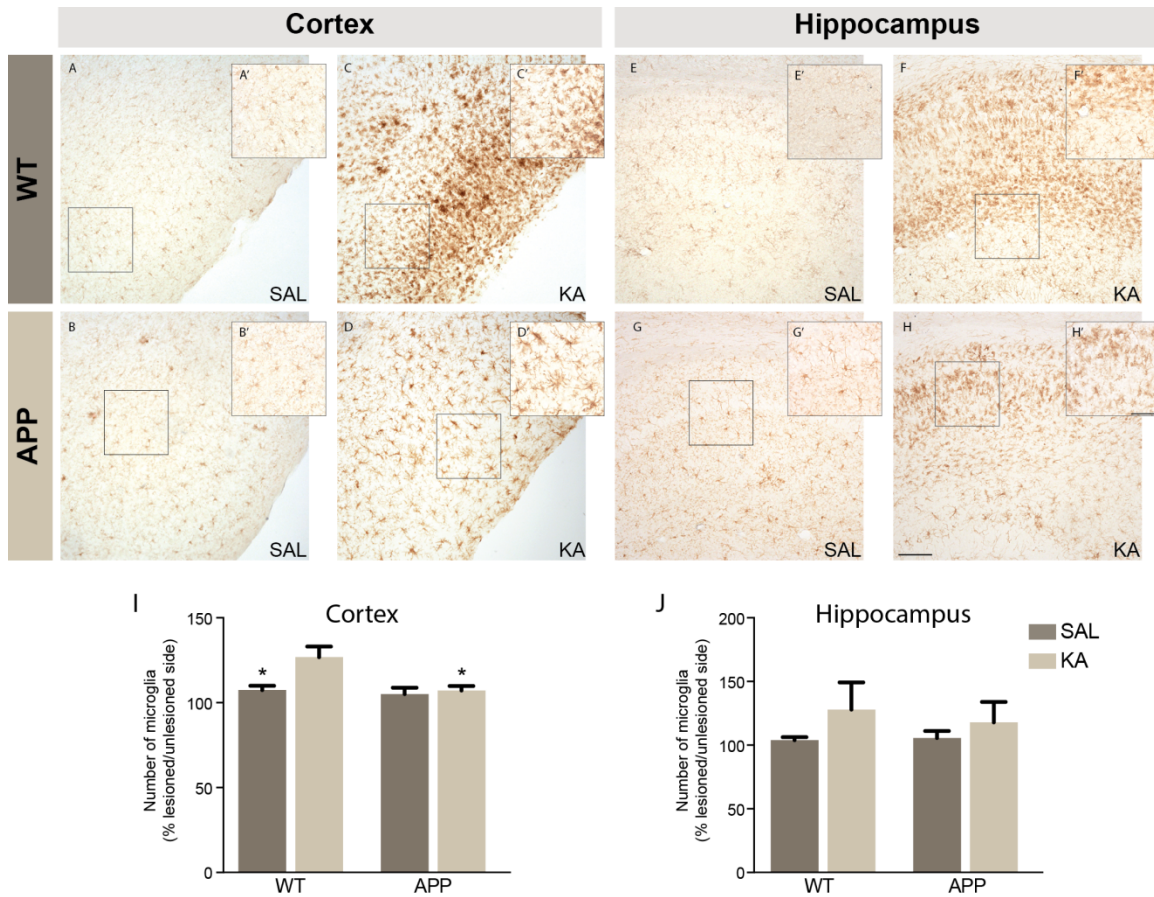


Figure 2.4. Impact of KA injections on the immune response. Representative images of microglia cells (Iba-1), revealed with the chromogen 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), brown colour) in the cortex (A-D) and in the hippocampus (E-H) of WT and APPsw/PS1 mice that received either saline (SAL) or KA intrastratially 30 days previously. (I) Stereological quantification of microglia cells in the cortex and (J) in the hippocampus. Data (n=5-8 mice per group) are expressed as the means \pm SEM. Statistical analyses were performed by unpaired t-test. * $p < 0.05$ comparing WT-SAL or APP-KA to WT-KA. Scale bar: A-H: 5 μ m and A'-H': 2.5 μ m. Abbreviations: APP: APP/PS1 mice; dpi: days post-injections; KA: Kainic acid; SAL: saline; WT: wild type.

2.5.4 KA injection leads to an overproduction of A β and reduction of microglial cell associated with plaques

Finally, we evaluated whether the excitotoxic insult could affect the levels of A β (Fig. 2.5A-F). Western blot analysis of brain sample for the A β precursor, APP, demonstrated an increment in its expression in APP/PS1 exposed to KA (Fig. 2.5A; $p \leq 0.05$). This results on one side in the overproduction of the soluble form A β 40 and A β 42 (Fig. 2.5B $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$) and on the other side in an increase deposition of A β plaques in the lesioned group (Fig. 2.5 C-E; $p \leq 0.05$). When we evaluated the number of Iba-1 positive microglial cells associated with congo red positive A β plaques (Fig. 2.5C and D), we observed a lower number of microglia associated with plaques following KA injection (Fig. 2.5F). This supports the

hypothesis that the neuronal death induced by KA could prevents microglial motility and could additionally reduce their ability of phagocytosis (Hristovska and Pascual, 2016)

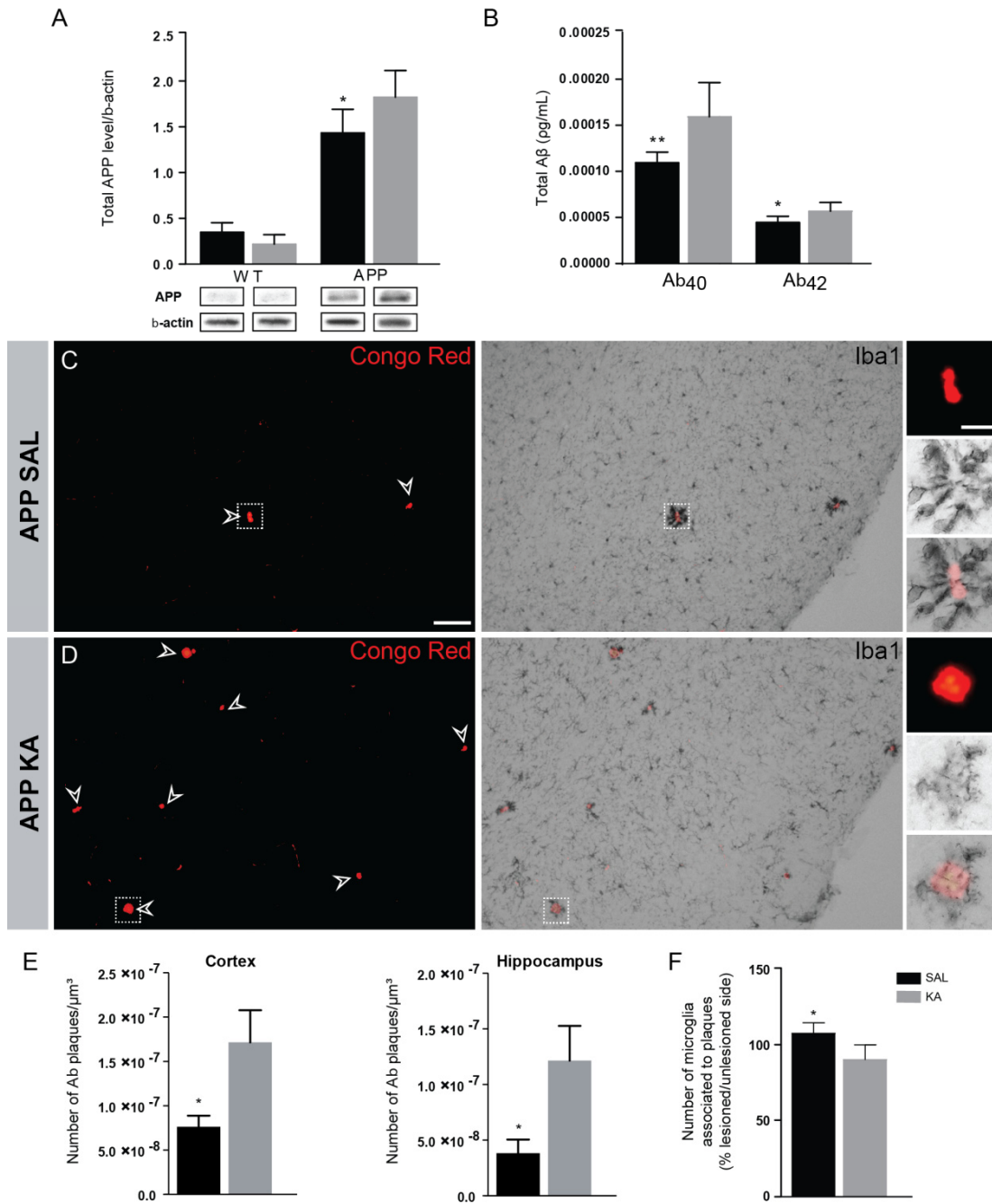


Figure 2.5 KA injection triggers a sustained overproduction of β -amyloid ($A\beta$). (A) Quantification by western blot analyses of brain level of the total amyloid precursor protein (APP) normalized to β -actin at 30 dpi ($n = 5-8$). Representative western blot bands derive from the same experiment and were cropped from the same blot. (B) Quantification of soluble $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ levels by ELISA at 30dpi ($n = 8$). (C and D) Representative images of $A\beta$ accumulation stained with CongoRed and the associated ionized calcium-binding adapter molecule 1 ($Iba-1^+$) microglia cells at 30dpi. (E) Stereological quantification of microglial cells in the cortex and hippocampus at 30dpi and (F) percentage of microglial cells associated with plaques. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-8$ mice per group). Statistical analyses were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (A) and unpaired t-test (B, E and F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing SAL to KA-lesioned APP_{sw}/PS1 group. Scale bar: C, D: 5 μ m; insets: 1.25 μ m. Abbreviations: APP: APP/PS1 mice; dpi: days post-injections; KA: Kainic acid; SAL: saline; WT: wild type.

2.6 Discussion

Excitotoxicity can be experimentally replicated using kainic acid (KA), a conformational analog of glutamate. This neurotoxin binds to specific kainate receptors on cholinergic and GABAergic neurons, provoking their over activation and leading among others to an abnormal intracellular Ca^{2+} concentration triggering cellular impairment, including mitochondrial dysfunction (Ong *et al.*, 2011) and ultimately neuronal apoptosis and necrosis (Danysz and Parsons, 2012). Here, we used this model to mimics the neuronal loss in AD context.

When the neurotoxin KA is unilaterally injected in the striatum, it generates a massive neuronal death across the whole brain, including the cortex and hippocampus, leading to cognitive deficits (Zheng *et al.*, 2011). Using a battery of behavioural test, here we showed that APP/PS1 mice presented aggravated motor and cognitive deficits post-excitotoxic damage when compared to their wild-type counterparts. The post mortem evaluation of neuronal loss validated the behavioural data, showing a more important neuronal death in the injected diseased mice when compared to the WT ones up to 30 dpi. Neuronal loss is also accompanied by a sustained Iba1+ microglial response in the lesioned mice, with a higher response in WT mice when compared to the APP/PS1 group. The peripheral immune response showed a decrease in the number of monocytes, both patrolling (CD11b+, CD115+, Ly6C^{low}) and inflammatory (CD11b+, CD115+, Ly6C^{high}) (Geissmann *et al.*, 2003), was observed in the AD model compared to their wild-type counterparts. Because of this, likely, the recruitment of monocytes into the brain, and thus presence of monocytes-derived macrophages, is limited 30 dpi. We previously demonstrated that excitotoxic insults generated by KA provoke a transitory recruitment of circulating monocytes at the lesion site where they differentiate into Iba1+ and CD68+ macrophages seven days post-lesion. Seven days after injection, monocyte-derived macrophages completely disappeared after the recovery of the mice (Bellavance *et al.*, 2015). A deregulation of the peripheral immune response might have an impact on neuroprotection and ultimately participate to the aggravation of the disease (Bellavance *et al.*, 2015). Indeed, the diminished number of patrolling monocytes caused by KA-induced neuronal death could be responsible of the higher neurodegeneration observed in the APP/PS1 mice compared to the WT. Indeed, we previously demonstrated that patrolling monocytes crawl along blood vessels and regulate A β levels within the lumen veins, routing it for eventually eliminate it (Michaud

et al., 2013). The same study revealed that the absence of patrolling monocytes in APP/PS1 mice induces an increase of A β levels in the cortex and hippocampus.

In parallel to the neuronal death triggered by the KA injections and the inflammatory response, we observed the effects of the neurotoxin on amyloid pathology. In fact, following KA injection, the APP/PS1 mice presented a higher level of soluble A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ as well as a more substantial number of plaques compared to their sham. Interestingly, a smaller number of microglial cells were associated with plaques following KA lesion. Likely, the phagocytic capabilities of microglia along with their migration and motility abilities are affected by the excitotoxic lesion.

In the brain, microglial cells are partly responsible for A β and cellular debris clearance (El Khoury *et al.*, 2007). There are evidences that A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ isoforms would be able to trigger chemoattraction of these cells (Simard *et al.*, 2006). Additionally, microglia cells are capable of surround plaques to eventually phagocytis them (Sokolowski *et al.*, 2013). For instance, microglia cells are the only cell type expressing triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) in the brain, which act as a signalling receptor that drives phagocytosis respond (Rivest, 2015). Being the only cell type expressing TREM2 in the brain, microglia can be activated by A β and exert a compensatory response to protect AD progression (Jiang *et al.*, 2014). After a KA insult, an important augmentation of TREM2 expression can be observed (Carson *et al.*, 2008 and data not shown). This response, however, provokes important pro-inflammatory molecules releases that are mostly noxious to surrounding environments, likely resulting into dysfunctional of microglia cells as well as synaptic damage (Jiang *et al.*, 2014).

2.7 Conclusion

In conclusion, our study allowed us to evaluate the interplay between excitotoxicity, neuronal death, immune response and the progression on the amyloid pathology which mainly characterizes the disease. The accumulation of the A β is probably caused by its defective elimination, which could eventually cause the exacerbation of neuronal death. Activation of

microglia cells receptors by A β would aggravate neurotoxicity via the excessive release of glutamate or pro-inflammatory mediators. Thus, a positive feedback cycle might sets in, where the neuronal death over activates microglia cells, affecting triggering the release of pro-inflammatory mediators.

2.8 Acknowledgments

We thank Marie-Michèle Plante for excellent technical assistance. The authors declare no conflict of interests.

2.9 Supplementary

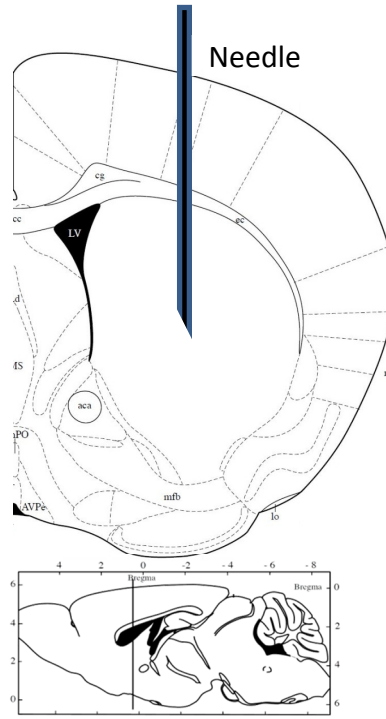


Figure 2.6. Stereotaxic injection in the right striatum from bregma coordinates 0.5 mm anteroposterior, -2.0 mm lateral and -3.5 mm dorsoventral

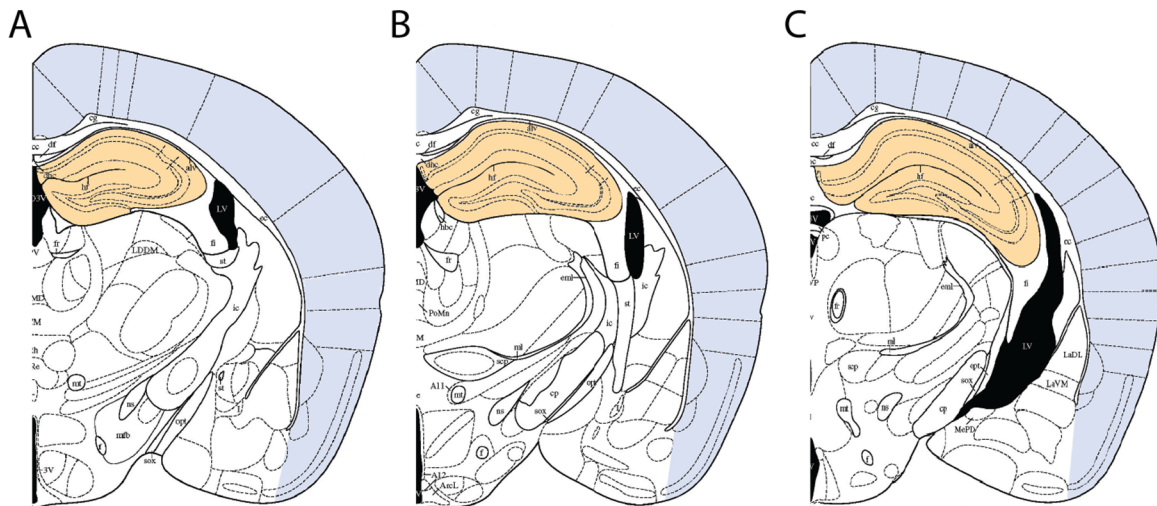


Figure 2.7. Area from bregma coordinates where stereological analyses were performed. (A) -1.58, (B) -1.94, and (C) -2.30 mm in cortex (blue) and hippocampus (orange)

2.10 Références

- Barger SW, Basile AS (2001). Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function. *J. Neurochem.* 76: 846–854.
- Ben-Ari, Y. (2010). Kainate and Temporal Lobe Epilepsies : 3 decades of progress. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th edition
- Benilova, I., Karran, E., & Strooper, B. De. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer ' s disease : an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.*, 15(3), 1–9
- Bellavance M-A, Gosselin D, Yong WV, Stys PK, Rivest S (2015) Patrolling monocytes play a critical role in CX3CR1 mediated neuroprotection during excitotoxicity. *Brain Struct Funct.* 220(3):1759-76
- Bernstein, S. L., Dupuis, N. F., Lazo, N. D., Wyttbach, T., Condrón, [...] & Bowers, M. T. (2010). Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem*, 1(4), 326–331. 0
- Bezprozvanny, I. (2009) Amyloid goes global. *Sci. Signal.* 2, 63, pp. pe16
- Bodea L.-G., Wang, Y., Linnartz-Gerlach, B., [...] and Neumann, H. (2014) Neurodegeneration by Activation of the Microglial Complement–Phagosome Pathway. *J. Neuro.*, 34(25):8546–8556
- Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 15(4), 209–16.
- Cárdenas-Aguayo, MC., Silva-Lucero, MC., Cortes-Ortiz, M., Jiménez-Ramos, L., [...] & Meraz-Ríos, M. A (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity, *Neurochemistry*, InTech, [En ligne] <http://www.intechopen.com/books/neurochemistry/physiological-role-of-amyloid-beta-in-neural-cells-the-cellular-trophic-activity>, page consultée le 03/07/2016
- Carson, M. J., Crane, J. & Xie A. (2008). Modeling CNS microglia: the quest to identify predictive models. *Drug Discov Today Dis Models.* 2008; 5(1): 19–25.
- Danysz, W., & Parsons, C. G. (2012). Alzheimer ' s disease , b -amyloid , glutamate , NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *Brit. J. of Pharma.*, 167.
- Dong X-X, Wang Y, Qin Z-H (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 30:379–387.
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.*, 13(4), 432–438.
- Fernandez-Tome P, Brera B, Arevalo MA, de Ceballos ML (2004). Beta-amyloid25-35 inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol Dis* 15: 580–589.
- Ginhoux F & Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014 Jun;14(6):392-404
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
- Hiltunen, M., Groenb, T. van, & Jolkonen, J. (2009). Functional Roles of Amyloid-beta Protein Precursor and Amyloid-beta Peptides : Evidence from Experimental Studies. *J. Alzheimer's Dis.*, 18, 401–412.
- Hong, J., Cho, I.-H., Kwak, K. II, [...] Lee, S. J. (2010). Microglial Toll-like receptor 2 contributes to kainic acid-induced glial activation and hippocampal neuronal cell death. *J. Biol Chem.* 285(50), 39447–57

- Hristovska, I., & Pascual, O. (2016). Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front. Integ. Neurosci.*, 9(January), 1–7.
- Jiang, T., Tan, L., Zhu, X.-C., Zhang, Q.-Q., Cao, L., Tan, M.-S., ... Yu, J.-T. (2014). Upregulation of TREM2 Ameliorates Neuropathology and Rescues Spatial Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology*, 39(10), 2949–2962.
- Karran, E., Mercken, M., & Strooper, B. De. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Disc.*, 10(9), 698–712
- Liu, L., Hamre, K. M., & Goldowitz, D. (2012). Kainic Acid-Induced Neuronal Degeneration in Hippocampal Pyramidal Neurons Is Driven by Both Intrinsic and Extrinsic Factors : Analysis of FVB / N7C57BL / 6 Chimeras. *Neurobio. Dis.*, 32(35), 12093–12101.
- Michaud J-P, Bellavance M-A, Préfontaine P, Rivest S. (2013) Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Rep.*; 5: 646–653
- Murphy, P., & LeVine, H. (2010). Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimer's Dis*, 19(1), 1–17.
- Neher, J. J., Neniskyte, U., & Brown, G. C. (2012). Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: Potential roles in neurodegeneration. *Front. in Pharmacol.*, 3 FEB(February), 1–9.
- Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci* 2007; 120: 4081–91.
- Ong, W. Y., Tanaka, K., Dawe, G. S., Ittner, L. M., & Farooqui, A. a. (2013). Slow excitotoxicity in alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.*, 35(4), 643–668
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.*, 13(7), 812–818
- Parameshwaran K, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp. Neurol.* 2008; 210: 7–13.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N. Engl J. Med* 362(4):329–344.
- Rivest, S. (2015). TREM2 enables amyloid β clearance by microglia. *Cell Res.*, 25(5), 535–536.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiol. Rev.* 81(2), 741–767.
- Simard, A. R., Soulet, D., Gow- ing, G., Julien, J. P., and Rivest, S. (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49, 489–502
- Sokolowski, J. D., & Mandell, J. W. (2011). Phagocytic clearance in neurodegeneration. *Am. J. Pathol.*, 178(4), 1416–1428.
- Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MR, [,,] & Green KN (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain*, 2016, 1-17
- Vincent, P., & Mulle, C. (2009). Kainate Receptors in Epilepsy and Excitotoxicity. *Neurosciecn*, 158(1), 309–323.
- Wildsmith, K. R., Holley, M., Savage, J. C., Skerrett, R., & Landreth, G. E. (2013). Evidence for impaired amyloid β clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* 5(33), 1–6.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A et al. (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*; 382: 685–691.
- Zheng, X. Y., Zhang, H. L., Luo, Q. & Zhu, J. (2011). Kainic acid-induced neurodegenerative model: Potentials and limitations. *J. Biomed. Biotech.*, 2011.

3. Discussion

Nous supposons que la mort neuronale est plus qu'une conséquence de la MA; elle constituerait en fait en un mécanisme contributif, aggravant la cascade pathologique. Induite par l'injection de KA, nous avons causé une excitotoxicité dans le cerveau de modèles murins afin d'étudier les répercussions sur l'organisme en contexte Alzheimer.

3.1 Retour sur les résultats

La mort neuronale induite par le KA engendre une multitude de répercussions, autant au niveau de la périphérie que dans le système nerveux central.

3.1.1 Aggravation des déficits cognitifs

D'abord, la mort neuronale induite par le KA touche principalement la zone d'injection, en l'occurrence le striatum, et ensuite se répand aux cellules de la zone hippocampique et de façon non négligeable à l'aire corticale (voir la **Figure 2.2**). Il en résulte des déficits en lien direct avec la fonction de ces zones, soit la mémoire spatiale, le comportement et l'attention (Zheng *et al.*, 2011). L'analyse post-injection au KA a d'abord permis d'étudier la santé générale des modèles, où le pourcentage de survie fut diminué et une perte significative de poids chez les animaux lésés fut observée (voir **Figure 2.1A-B**). Notamment, cette différence est plus importante chez les souris Alzheimer comparativement aux souris WT. Ensuite, nous avons investigué le comportement le plus répandu du règne animal: la nidification (voir **Figure 2.1C**). Très importante, voire essentielle, elle permet entre autres à l'animal de conserver sa chaleur et facilite la reproduction (Deacon, 2006). En ce qui a trait à notre expérience,

une note de 1 à 5 était attribuée en fonction de l'état du nid, 1 étant pratiquement inexistant et 5 correspond à un nid parfait. Les souris traitées au KA ont démontré une nidification significativement moins élaborée relativement aux souris traitées au salin. Cette altération comportementale suite à l'injection de KA se retrouve également accentuée lorsque les souris ont le génotype APP comparativement au WT. Ensuite, l'évaluation neurologique en 5 points (activité spontanée, symétrie des mouvements, la grimpe, proprioception et l'étirement des pattes) a démontré une exacerbation des déficits chez les souris Alzheimer traitées au KA significativement plus importante comparé encore à leur homologue traité au salin ou encore aux souris WT traitées au KA (voir **Figure 2.1D**). Aussi, la coordination des membres à l'effort de même que l'équilibre a été évaluée en plaçant l'animal sur une roue tournante à accélération constante (voir **Figure 2.1E**). L'on remarque encore une fois à la suite d'injection de KA une atteinte plus importante chez les souris APP comparativement aux souris WT, puisque le temps passé sur la plateforme avant d'y en tomber est significativement plus petit. Puis, l'apprentissage spatial fut évalué avec le test du labyrinthe en forme de T où l'animal devait nager vers l'une des extrémités où se trouvait une plateforme (voir **Figure 2.1F**). La phase d'apprentissage de l'animal consistait au nombre d'essais requis pour se rendre ultimement à l'échappatoire en un seul trajet, et ce sur 5 fois consécutives. Ce nombre d'essais fut plus important à la suite de l'injection de KA chez les souris APP autant en comparaison aux souris WT traitées au KA ou aux souris APP traitées au salin.

Finalement, la réponse aux dommages des neurones nécrotiques aurait un impact contributif à la mort neuronale en contexte Alzheimer. En effet, plus de dégénérescence neuronale est observée chez les souris APP comparativement au WT suite à l'injection de KA (voir **Figure 2.2**). Cette différence persiste même dans le temps, que ce soit à 3 ou 30 jours post-injection (jpi). Ainsi, les effets de la mort neuronale prolongée pourraient entraîner une suractivation des microglies et par le fait même une exacerbation du milieu pro-inflammatoire, ce qui pourrait avoir un rôle dans l'aggravation de la MA.

3.1.2 Inhibition du recrutement monocytaire

À la suite d'une lésion excitotoxique engendrée par le KA, un recrutement marqué de monocytes s'ensuit au site de lésion (Bellavance *et al.*, 2015). Notre étude en cytométrie de flux sur des échantillons sanguins (voir **Figure 2.3A**) a démontré qu'effectivement, au niveau périphérique chez les souris WT, une augmentation des niveaux de monocytes s'ensuit après l'injection de KA. Toutefois, une quantité moins importante de monocytes totaux, inflammatoires et patrouilleurs chez les souris APP est observée à la suite du traitement au KA (voir **Figure 2.3B-D**). Ceci suggère un dérèglement dans la réponse immunitaire au niveau du système nerveux périphérique dans la MA, ce qui pourrait expliquer la neurodégénérescence accrue des souris APP/PS1 comparé au WT lorsqu'il y a injection de KA (Bellavance *et al.*, 2015). Des évidences chez les patients MA suggèrent également une inflammation dans le système nerveux périphérique, un dérèglement dans le métabolisme périphérique et ultimement des dommages neuronaux (Clarke *et al.*, 2015; Delaby *et al.*, 2015). Dans notre modèle, comme le KA diffuse de façon passive et est perméable à la BHE (Gynther *et al.*, 2014), il se retrouve fort probablement par diffusion dans la circulation sanguine et peut affecter du même coup les neurones de la périphérie. Ces dernières pourraient vraisemblablement être hypersensibles dans un contexte Alzheimer, réagissant plus fortement au KA et du même coup affectant les niveaux de monocytes sanguins plus significativement.

Au niveau du système nerveux central, un marquage immunohistochimique à permis de cibler les cellules microgliales et d'ainsi les dénombrer (voir **Figure 2.4**). Le traitement au KA, comparativement au salin, engendre bel et bien un recrutement de microglies au SNC. Toutefois, ce recrutement se voit significativement diminué en contexte Alzheimer. En effet, les souris APP démontrent une quantité moindre de cellules microgliales à la suite du traitement au KA en comparaison aux souris WT ayant subi le même traitement. Ceci pourrait suggérer un défaut de migration de ces cellules. Ces dernières pourraient probablement être affectées par les signaux de dommages des neurones, de même que la mauvaise transmission des

neurotransmetteurs. Une autre hypothèse pouvant être soulevée est celle de l'adhésion cellulaire. Peut-être qu'en contexte d'excitotoxicité les progéniteurs des cellules microgliales ne peuvent adhérer adéquatement au tissu lésé et ainsi ne peuvent infiltrer ce dernier. À ce stade, ces hypothèses restent des suppositions et des analyses ultérieures doivent être entamées afin de répondre à ces questions. Quoiqu'il en soit, les cellules microgliales sont bels et bien affectées par la mort neuronale induite par le KA en contexte de surproduction d'A β .

Bien que la quantité de microglies se soit avérée moindre chez les souris APP versus les souris WT à la suite d'injection de KA à 30 jpi, une analyse en hybridation *in situ* de tranches de cerveaux à 3 jpi fut réalisée. Puisque c'est à ce temps où la réponse microgliale est à son apogée (Bellavance *et al.*, 2015), l'analyse *in situ* à 3 jpi se voulait une tentative pour expliquer le mécanisme moléculaire de la neurodégénérescence. Cela permit de démontrer un accroissement de l'inflammation via TLR2, venant avec un accroissement des protéines TREM2 et STAB1, à la suite d'injection de KA (**Figure 3.1**). Toutefois, le KA n'a pas le même effet chez les souris saines WT et les souris représentant la MA. Effectivement, l'analyse a permis d'observer une suractivation via le récepteur TLR2 chez les souris APP à la suite d'injection de KA, dénotant une sensibilité accrue (**Figure 3.1**). Normalement, plus les dommages sont importants, plus l'activation des cellules microgliales est considérable, ce qui concorde avec notre résultat. Ceci dit, il est surprenant que l'activation se retrouve exacerbée alors qu'on a conclu qu'il y a un nombre moins important de cellules.

Or, dans un tel modèle de mort neuronale et de production d'A β , les microglies sont en constante stimulation, provoquant la relâche de molécules pro-inflammatoires ou neurotoxiques, aggravant du même coup la mort neuronale. L'inflammation cérébrale est un marqueur clé de la MA et le récepteur TLR2 serait impliqué non seulement dans l'activation des microglies, mais aussi dans la mort neuronale dans la région de l'hippocampe (Hong *et al.*, 2015). Cette stimulation aberrante engendrerait une relâche excessive de glutamate, ce qui pourrait expliquer l'aggravation de l'excitotoxicité et

des dommages neuronaux observée chez les souris APP (Barger et Basile, 2001; Fernandez-Tome *et al.*, 2004).

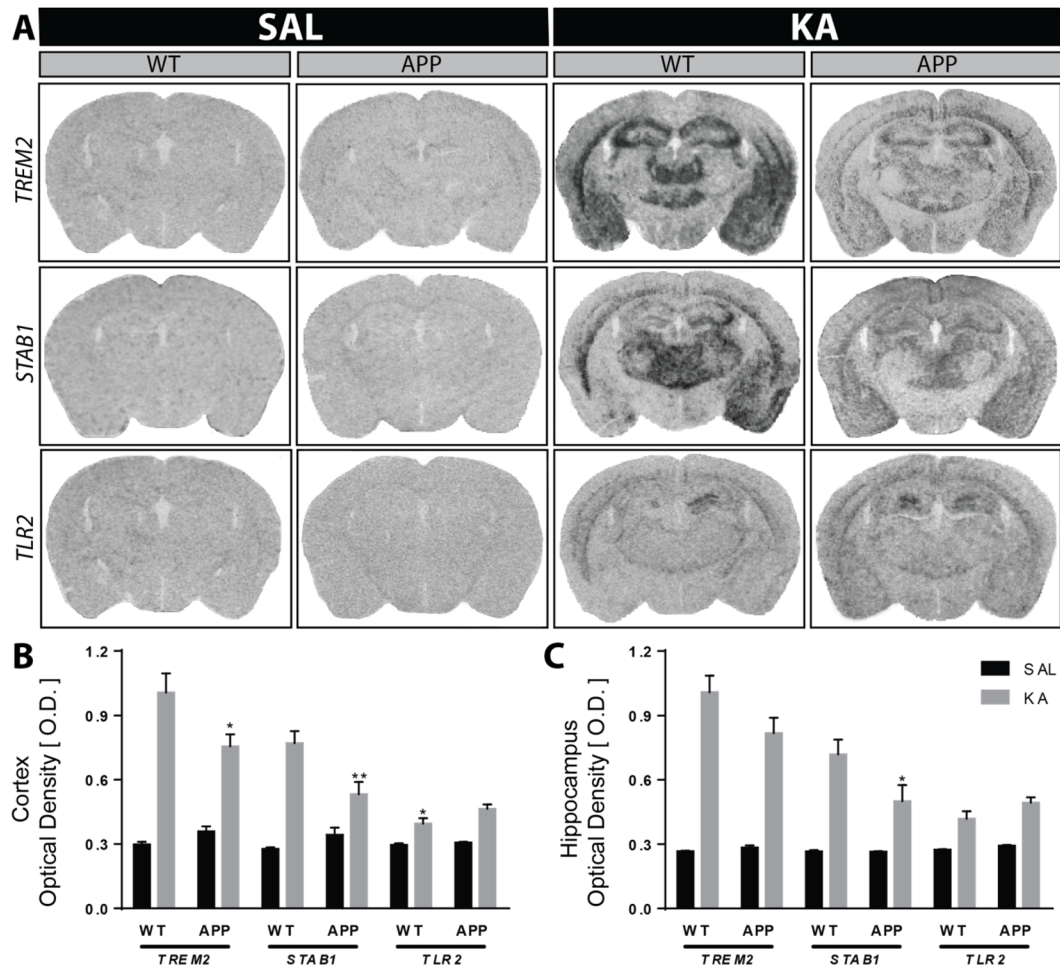


Figure 3.1. Intrastratial injection of KA deregulates transmembrane protein mRNAs expression in the brain of APPswe/PS1 mice.(A) Representative photomicrographs of coronal sections showing the levels of triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (*TREM2*), stabilin-1 (*STAB1*) and toll like receptor 2 (*TLR2*) mRNA by *in situ* hybridization in WT and APP_{swe}/PS1 mice that received either saline or KA intrastratially. Optical density quantifications of the expression levels of *TREM2*, *STAB1* and *TLR2* mRNA in the cortex (B) and hippocampus (C). Data are expressed as mean \pm SEM (n=5-8 mice per group). Statistical analyses were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. * p < 0.05, ** p < 0.01 comparing WT-KA to APP-KA.

3.1.3 Aggravation de la pathologie amyloïde

Toujours au niveau du système nerveux central, un marquage au Congo Red à permis de cibler spécifiquement les dépôts amyloïdes sous forme de plaques (voir **Figure 2.5C-E**). Chez les souris APP, leur dénombrement s'est avéré être significativement plus élevé après l'injection de KA. De plus, à l'aide d'un transfert de protéines

provenant des lysats des cerveaux, l'APP s'est avérée être également plus présente dans les cerveaux APP après traitement au KA (voir **Figure 2.1A**). Aussi, les niveaux solubles d'A β 40 et A β 42 furent obtenus par Éliisa (voir **Figure 2.5B**) et même constat: augmentation à la suite du traitement au KA.

Nous avons démontré précédemment une concentration moindre de monocytes patrouilleurs à la suite d'injection de KA, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation des niveaux d'A β . En effet, notre laboratoire démontra en 2013 que l'absence de monocytes Ly6C^{low} chez les souris APP/PS1 entraîne un surplus d'A β (Michaud *et al.*, 2013a). Cette augmentation des niveaux d'A β suggère aussi un dérèglement dans la voie d'élimination de ce peptide. La moindre quantité de microglies pourrait sans doute expliquer l'augmentation d'A β , mais il y a plus. En effet, il est possible de se questionner sur l'état phagocytaire des microglies restantes. L'étude *in situ* permit d'observer une diminution de l'expression de la protéine ayant un rôle dans la phagocytose de l'A β , c'est-à-dire TREM2 (**Figure 3.1**). Ce dernier, exprimé par les microglies, agit comme signal en réponse à l'A β commandant la phagocytose (Rivest, 2015). La prévalence de l'inflammation dans le contexte Alzheimer en provenance des débris cellulaire et de l'A β affect sans aucun doute les microglies, ce qui pourrait possiblement expliquer la diminution de l'expression de TREM2. De ce fait, puisqu'il est significativement diminué à 3 jpi de KA chez les souris APP comparativement au WT, il est possible d'affirmer que la phagocytose de l'A β par les microglies en contexte Alzheimer via TREM2 est clairement atteinte par la mort neuronale.

De surcroît, les microglies associées aux plaques (observés à l'aide d'un double marquage) sont significativement diminuées en contexte Alzheimer à la suite d'injection de KA (voir **Figure 2.5F**). Normalement, les cellules migrogliales sont attirées au peptide, les entourent et les éliminent (Sokolowski *et al.*, 2013). Toutefois, cette réduction des microglies associées aux plaques pourrait appuyer l'hypothèse de diminution des capacités de migration de ces cellules à la suite de morte neuronale induite par le KA, de même qu'expliquer l'augmentation des niveaux d'A β .

Autre facteur contribuant à l'augmentation des niveaux d'A β : la stimulation chronique des microglies. En effet, la suractivation de ces cellules via les récepteurs NMDARs, autant par l'A β lui-même que la concentration excessive de glutamate, entraînerait une diminution de l'élimination du peptide, puisque ces récepteurs coopèreraient à l'internalisation de l'A β (Bi *et al.*, 2002).

Finalement, le récepteur stabilin-1 (STAB1) est aussi diminué 3 jpi de KA chez les souris APP comparativement à leurs homologues WT (**Figure 3.1**). Ce récepteur est impliqué dans la régulation leur état phagocytaire par la reconnaissance de signal apoptotique phosphatidylserine (PS) (Park *et al.*, 2009). C'est donc dire qu'en raison de la mort neuronale induite par KA, ou du moins à cause du milieu pro-inflammatoire généré en contexte Alzheimer, les microglies sont probablement moins habilitées à reconnaître les signaux de dommages aux neurones via le récepteur STAB1 comparativement aux microglies de souris WT. Apparemment, l'excitotoxicité pourrait diminuer la phagocytose des débris cellulaires et empêcherait du même coup le nettoyage du milieu environnant. Le milieu devenant de plus en plus toxique pourrait ultimement participer à l'aggravation de la mort neuronale.

3.2 Synergie entre l'excitotoxicité et la maladie d'Alzheimer

Il existe une synergie directe entre l'excitotoxicité et la progression de la MA. Effectivement, l'activation des récepteurs ionotropiques glutamates se produit de façon excessive en contexte de la pathologie. L'accumulation d'A β caractérisant la maladie aura pour effet de provoquer plus d'excitotoxicité, puisque lorsqu'il est en présence d'astrocytes et de microglies, le peptide induit une relâche de glutamate dans le milieu extra-synaptique (Talanta *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2006).

L'homéostasie calcique se voit du même coup dérégulée, causant ultimement une mort neuronale. Cette dégénérescence provoque la relâche de signaux de dommages dans

l'environnement et par le fait même une activation accrue des cellules microgliales. Ces dernières secrèteront des molécules pro-inflammatoires en réponse à ces signaux, contribuant à l'inflammation du cerveau. Décrite autant comme nécessaire que néfaste, cette inflammation provoquerait, à long terme et selon notre expérience, une diminution de la phagocytose, ou du moins un surplus d'A β . L'accumulation du peptide multipliera la relâche de glutamate, mais aussi activera chroniquement les microglies, rajoutant de l'inflammation au milieu.

C'est donc dire qu'une boucle de rétrocontrôle s'installe, où la mort neuronale a des effets sur les microglies, qui ont des effets sur les niveaux d'A β , qui eux ont des effets autant sur la mort neuronale que sur les microglies, et c'est reparti. Ultimement, une surproduction d'A β accélérera la MA et les symptômes qui y sont rattachés.

3.3 Perspectives futures

Les résultats de recherche ont permis d'établir un lien direct entre la mort neuronale induite par le KA et la progression de la MA. La présente étude reste toutefois descriptive et bien que l'aggravation de la pathologie amyloïde soit claire, d'autres tests sont requis dans un avenir rapproché afin d'éclaircir la mécanistique entourant cette conclusion. Par exemple, tester chez des souris APP l'injection de KA en présence ou non de bloqueurs des récepteurs au glutamate (ex.: MK801; Danys et Parson, 2012) permettrait de valider l'étude. Ou encore, tester chez des souris APP l'effet du KA lorsqu'elles sont préalablement injectées avec des bloqueurs du récepteur RAGE (ligand HMGB1; Bianchi, 2007) permettrait de moduler les dommages au cerveau. Puis, tester la phase chronique d'inflammation, chez la microglie *in vitro*, en présence d'une faible concentration, mais constante d'A β . Ceci permettrait de représenter plus fidèlement la réponse des microglies face à des niveaux d'A β représentatif chez un patient humain et par le fait même d'isoler plus précisément la mécanistique moléculaire affectée par cette réponse. Finalement, la presenilin-1 (PS1), protéine faisant partie du complexe formant la γ -secrétase, pourrait aussi être une cible thérapeutique. Cette dernière jouerait

un rôle important dans la sensibilité à l'excitotoxicité neuronale puisqu'elle contribuerait au dérèglement de l'homéostasie calcique (Grilli *et al.*, 2000)

3.4 Potentiel clinique

Bien que l'injection de KA ne soit pas représentative d'une pathologie humaine, elle sert à mieux comprendre l'interaction entre l'excitotoxicité glutaminergique et la progression de la pathologie amyloïde. La phase chronique d'inflammation engendrée non seulement par l'A β , mais aussi par les débris cellulaires des neurones en dégénérescence, doit être la cible première des thérapies contre la MA. La mort neuronale quant à elle pourrait être ralenti via des bloqueurs des récepteurs glutamates afin de limiter la progression de la maladie. Également, une stimulation des processus de motilité et de phagocytose des microglies pourrait être envisagée, en faisant attention toutefois de ne pas promouvoir l'inflammation au cerveau.

4. Conclusion

La maladie d'Alzheimer présente une mécanistique des plus complexes. Les hypothèses permettant d'expliquer la mort neuronale engendrée comprennent l'enchevêtrement de la protéine Tau et l'accumulation de l'A β . Cette dernière qui est de loin la plus discutée dans la littérature scientifique, mais elle n'explique qu'en partie la physiopathologie de la maladie. Le peptide est neurotoxique lorsqu'il est mal replié et qu'il s'auto-associe, formant des oligomères et des dépôts sous forme de plaques. Neurotoxique d'une part parce qu'ils lient les récepteurs glutamates des neurones et cause un dérèglement dans les voies de neurotransmission, mais aussi parce qu'il active de façon chronique les microglies, cellules de défense du SNC. Les neurones apoptotiques libèrent dans les milieux des signaux de dommages, activant eux aussi les microglies. L'activation de ces cellules résulte en une production accrue de molécules pro-inflammatoires, tout aussi toxique pour les neurones environnants.

L'étude introduisant la mort neuronale à l'aide d'injection d'acide kainique dans un modèle murin d'Alzheimer, où ordinairement il n'y a pas ou peu de mort neuronale, permet d'observer l'interaction entre la mort neuronale et la progression de la pathologie amyloïde. Ultiment, la dégénérescence neuronale entraîne une accumulation plus importante de la protéine A β , probablement en raison de sa mauvaise élimination. D'autre part, cette accumulation de protéine causera une mort neuronale plus importante. Bref, un cycle de rétroaction positive s'installe, où la mort neuronale suractive les microglies, ce provoque un milieu pro-inflammatoire et accroît la concentration d'A β , qui ultimement exacerbera la mort neuronale. La mort neuronale est donc plus qu'une conséquence de la MA: elle constituerait en fait en un mécanisme contributif, aggravant la cascade pathologique.

Références

Alzheimer's Association. (2015). 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*, 11(3)332. 1-85

Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797), 782–787.

Bates, K., Verdile, G., Li, Q.-X., Ames, D., [...] & Martins, R. N. (2008). Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol. Psy.*, 14(5), 469–486.

Barber, R. (2012). The Genetics of Alzheimer's disease. *Hindawi Pub. Corp.*, 2012, 1–14.

Barger SW, Basile AS (2001). Activation of microglia by secreted amyloid precursor protein evokes release of glutamate by cystine exchange and attenuates synaptic function.. *J. Neurochem* 76: 846–854.

Bellavance M-A, Gosselin D, Yong WV, Stys PK, Rivest S (2015) Patrolling monocytes play a critical role in CX3CR1 mediated neuroprotection during excitotoxicity. *Brain Struct. Funct.* 220(3):1759-76.

Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease : an emperor in need of clothes. *Nat. Neuro.*, 15(3), 1–9

Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease : Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol. Aging*, 19(3), 173–189.

Bernstein SL, Dupuis NF, Lazo ND, Wytenbach T, [...] & Bowers, MT (2009) Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat. Chem.* 1(4):326–31.)

Berridge, M. J. (2013). Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. *Prion*, 7(1), 2–13.

Berrios, G. E. (1990). Alzheimer's Disease: a Conceptual History. *Int. J. Ger. Psy.*, 5(6), 355–365.

Bettens, K., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurol.*, 12(1), 92–104.

Bezprozvanny, I. (2009) Amyloid goes global. *Sci. Signal.* 2, 63, pp. pe16

Bianchi, ME. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 81(1)1-5

- Bi, X., Gall, C. M., Zhou, J. & Lynch, G. (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112, 827-840.
- Błach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol. & Ther. Exp.*, 53(3), 245–253.
- Blasko, I., & Grubeck-Loebenstien, B. (2003). Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, 20(2), 101–113.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–39.
- Borchelt, D. R., Ratovitski, T., Van Lare, J., Lee, MK., [...] & Sisodia, S. S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4), 939–945.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, MK., [...] & Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron*, 17(5), 1005–1013.
- Boutajangout, A., & Wisniewski, T. (2013). The Innate Immune System in Alzheimer's Disease. *Int. J. Cell Biol.*, 2013, 1–8.
- Britschgi, M., & Wyss-Coray, T. (2007). Systemic and Acquired Immune Responses in Alzheimer's Disease. *Int. Rev. Neurobiol.*, 82(07), 205–233.
- Caccamo, A. et al. (2005) Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol. Aging* 26, 645–654
- Cameron, B., & Landreth, G. E. (2010). Inflammation, Microglia and AD. *Neurobiol. of Dis.*, 37(3), 503–509.
- Cárdenas-Aguayo, MC., Silva-Lucero, MC., Cortes-Ortiz, M., Jiménez-Ramos, L., [...] Meraz-Ríos, M. A (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity, *Neurochemistry*, InTech, [En ligne] <http://www.intechopen.com/books/neurochemistry/physiological-role-of-amyloid-beta-in-neural-cells-the-cellular-trophic-activity>, page consultée le 03/07/2016
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D., & Ploix, C. C. (2006). CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunol. Rev.*, 213, 48–65.
- Clarke, J. R., Lyra E Silva, N. M., Figueiredo, C. P., [...] De Felice, F. G. (2015). Alzheimer-associated A β oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol. Med.*, 7(2), 190–210.
- Chaplin, DD. (2010). Overview of the immune response. *J.of Allergy and Clin. Immunol.*, 125, S3–23

- Danysz, W., & Parsons, C. G. (2012). Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *Brit. J. of Pharmacol.*, 167(2): 324-52.
- Deane, R., Singh, I., Sagare, P., Bell, R., Ross, N., & Al, E. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*, 122(4), 1377–1392.
- Delaby, C., Gabelle, A., Blum, D., Schraen-Maschke, S., [...] Lehmann, S. (2015). Central nervous system and peripheral inflammatory processes in Alzheimer's disease: Biomarker profiling approach. *Front. Neurol.*, 24;6:181, 1–11.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini S. & Sawaya B. E. (2009) Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun; 29(6): 313–326.
- Dineley, K. T., Xia, X., Bui, D., David Sweatt, J., & Zheng, H. (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J.of Biol. Chem.*, 277(25), 22768–22780
- Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sinica*, 30(4), 379–387.
- ElAli, A., & Rivest, S. (2015). Microglia in Alzheimer's disease: A multifaceted relationship. *Brain Behav Immun*, Jul;55, 138–150.
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.*, 13(4), 432–438
- Fernandez-Tome P, Brera B, Arevalo MA, de Ceballos ML (2004). β -amyloid₂₅₋₃₅ inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. *Neurobiol. Dis.* 15: 580–589.
- Fiala M, Liu PT., Espinosa-Jeffrey, A., Rosenthal, MJ., [...] & Cashman, J. (2007) Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(31), 12849–12854
- Filali, M., Lalonde, R., & Rivest, S. (2009). Cognitive and non-cognitive behaviors in an APP^{swe}/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Gen., Brain and Behav.*, 8(2), 143–148.
- Foley, A. M., Ammar, Z. M., Lee, R. H., & Mitchell, C. S. (2015). Systematic review of the relationship between amyloid- β levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 44(3), 787–795
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.

- Gesue, R., Kohama, S. G., & Stenzel-Poore, M. P. (2014). Toll-Like Receptors and Ischemic Brain Injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 73(5), 1–9.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., ... M., and Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Gosselin, D., Bellavance, M.-A., & Rivest, S. (2013). IL-1RAcP signaling regulates adaptive mechanisms in neurons that promote their long-term survival following excitotoxic insults. *Front. Cell. Neurosci.*, 7(9), 1-9.
- Grilli, M., Diodato, E., Lozza, G., Brusa, R., [...] & Ongini, E. (2000). Presenilin-1 regulates the neuronal threshold to excitotoxicity both physiologically and pathologically. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 97(23), 12822–12827.
- Gu, Z., Cheng, J., Zhong, P., Qin, L., Liu, W., & Yan, Z. (2014). A β selectively impairs mGluR7 modulation of NMDA signaling in basal forebrain cholinergic neurons: implication in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 34(41), 13614–13628.
- Guo, Q., Wang, Z., Li, H., Wiese, M., & Zheng, H. (2011). APP physiological and pathophysiological functions : insights from animal models. *Nat. Publis. Group*, 22(1), 78–89.
- Gynther M, Petsalo A, Hansen SH, Bunch L, Pickering DS (2014) Blood-brain barrier permeability and brain uptake mechanism of kainic acid and dihydrokainic acid. *Neurochem. Res.* 40(3):542-9.
- Hall, J. E. (2015) Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13th edition. Elsevier Inc, Philadelphia, PA, USA. 1168p.
- Hardy, J. & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353–356.
- Harris, M. G., Hulseberg, P., Ling, C., Karman, J., Clarkson, B. D., Harding, J. S., ... Fabry, Z. (2014). Immune privilege of the CNS is not the consequence of limited antigen sampling. *Sci. Rep.* 4, 4422.
- Helzner, E. P., Scarmeas, N., Tang, M. X., & Schupf, N. (2008). Survival in Alzheimer disease: A multiethnic , population-based study of incident cases. *Neurology*, 71, 1489–1495.
- Heneka, M. T. (2006). Inflammation in Alzheimer's disease. *Clin. Neurosci. Res.*, 6, 247–260.
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Publis. Group*, 16(3), 229–236.
- Heneka, M. T., & O'Banion, M. K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.*, 184, 69–91
- Hickman SE, Allison EK, Khoury J El. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* 2008;28:8354–60.

- Hiltunen, M., Groenb, T. van, & Jolkkonen, J. (2009). Functional Roles of Amyloid-beta Protein Precursor and Amyloid-beta Peptides : Evidence from Experimental Studies. *J.of Alzheimer's Dis.*, 18, 401–412.
- Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.*, 5(10), 971–974.
- Hodges, J. R. (2006). Alzheimer 's centennial legacy : origins , landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects. *Brain*, 129(Pt 11), 2811–2822.
- Hong, J., Cho, I.-H., Kwak, K. Il, Suh, E. C., Seo, J., [...] & Lee, S. J. (2010). Microglial Toll-like receptor 2 contributes to kainic acid-induced glial activation and hippocampal neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* 285(50), 39447–57.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(5), 347–360.
- Iribarren P, Zhou Y, Hu J, Le Y, Wang JM. (2005) Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. *Immunol. Res.* 2005; 31(3):165-76.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12(2), 67–72.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., & Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res.*, 7(8), 656–664.
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., [...] & Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue b-amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific b-secretase. *Hum. Mol. Gen.*, 13(2), 159–170.
- Jiang, T., Tan, L., Zhu, X., Zhang, Q., [...] & Yu, J.-T. (2014) Upregulation of TREM2 Ameliorates Neuropathology and Rescues Spatial Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychophar.* 39(10), 2949–2962
- Jones, R., Minogue, A., Connor, T. & Lynch, M. (2013) Amyloid- β -Induced Astrocytic Phagocytosis is Mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 8 (1), 301-311
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., [...] & Stefansson, K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409), 96–9.
- Kanekiyo, T., & Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid-b clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.*, 20:6(93), 1–12
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186.

- Karran, E., Mercken, M., & Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10(9), 698–712
- Khan, F. A., & Khan, M. F. (2010). Inflammation and acute phase response. *Int. J. Applied Biol. and Pharmac. Technol.*, 1(2), 312–321
- Kolarova, M., Garc, F., Bartos, A., Ricny, J., Ripova, D., & Gene, T. T. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.*, 2012, 1–13.
- Lawther, B. K., Kumar, S., & Krovvidi, H. (2011). Blood–brain barrier. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*, 11(4), 128–132.
- Lerma, J., & Marques, J. M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron*, 80(2), 292–311.
- Liu, L., Hamre, K. M., & Goldowitz, D. (2012). Kainic Acid-Induced Neuronal Degeneration in Hippocampal Pyramidal Neurons [...]: Analysis of FVB/N7C57BL/6 Chimeras. *J. Neurosci* 32(35), 12093–12101.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., [...] & Fassbender, K. (2012). TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation. *J. Immunol.*, 188(3), 1098–1107.
- Liu Y. & Zhou J. (2013) Oligodendrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Biol.* 8(2), 127-133
- Lue LF, Walker DG, Brachova L, [...] & Yan SD (2001) Involvement of microglial receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol.* 171(1):29-45.
- Maccioni, R.B., Farias, G., Morales, I., and Navarrete, L. (2010). The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.*, 41, 226–231.
- Manavalan, B., Basith, S., & Choi, S. (2011). Similar structures but different roles-an updated perspective on TLR structures. *Front. Physiol.*, 27(2):41, 1–13.
- Matos M., Augusto E., Oliveira CR., Agostinho P. (2008) Amyloid- β peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience.* Oct 28;156(4):898-910.
- Maurer, K., Volk, S., & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, vol 349: 1546-1549.
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *CSH Persp. in Med.*, 2, 1–18.
- Melchior, B., Garcia, A. E., Hsiung, B.-K., [...] & Carson, M. J. (2010). Dual induction of TREM2 and tolerance-related transcript, Tmem176b, in amyloid transgenic mice: implications for vaccine-based therapies for Alzheimer's disease. *ASN Neuro*, 2(3), 157-170

- Michaud, J.-P., Bellavance, M.-A., Préfontaine, P., Rivest, S. (2013a) Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Rep*; 5: 646–653
- Michaud, J.-P., Hallé, M., Lampron, A., Thériault, P., [...] & Rivest, S. (2013b). Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 110(5), 1941–6.
- Michaud, J. P., & Rivest, S. (2015). Anti-inflammatory Signaling in Microglia Exacerbates Alzheimer's Disease-Related Pathology. *Neuron*, 85(3), 450–452.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clini. Microbiol. Rev.*, 22(2), 240–273.
- Morley, J. E., Farr, S. A., Banks, W. A., Johnson, S. N., Yamada, K. A., & Xu, L. (2010). A Physiological Role for Amyloid-beta Protein : Enhancement of Learning and Memory. *J. Alzheimers Dis.*, 19(2):441, 1–20
- Morrone, C., Liu, M., Black, S., & McLaurin, J. (2015). Interaction between therapeutic interventions for alzheimer's disease and physiological A?? clearance mechanisms. *Front. Aging Neurosci.*, 7(APR), 1–16.
- Mufson, E. , Counts, S. E., Perez, S. E., & Ginsberg, S. D. (2009). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev. Neurother.*, 8(11), 1703–1718.
- Murphy, P., & LeVine, H. (2010). Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 1–17.
- Neher, J. J., Neniskyte, U., & Brown, G. C. (2012). Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: Potential roles in neurodegeneration. *Front. Pharmacol.*, 3 (27), 1–9.
- Nixon, R.A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol. Dis.* 43, 38–45.
- O'brien, R. (2015) Amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Aging Neurosci.* [En ligne] <http://sage.buckinstitute.org/amyloid-beta-and-alzheimers-disease/> Page consultée le 06/06/2016
- O'Brien, R., & Wong, P. (2011). Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annual Rev. Neurosci.*, 1987, 185–204.
- O'Neill, L., Golenbock, D. & Bowie A. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460
- Ong, W. Y., Tanaka, K., Dawe, G. S., Ittner, L. M., & Farooqui, A. a. (2013). Slow excitotoxicity in alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 35(4), 643–668

- Pachter, J. S., de Vries, H. E., & Fabry, Z. (2003). The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62(6), 593–604.
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.*, 13(7), 812–818
- Panegyres, P. K., & Atkins, E. R. (2011). The Functions of the Amyloid Precursor Protein Gene and Its Derivative Peptides : II Experimental Evidence and Clinical Studies. *Neurosci. Med.*, 2, 239–267.
- Park, S., Jung, M., Lee, S., Kang, K., Gratchev, A., Riabov, V., [...] Kim, I. (2009). Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. *J. Cell Sci.*, 122, 3365-3373
- Pearson, H. A., & Peers, C. (2006). Physiological roles for amyloid β peptides. *J. Physiol*, 575(1), 5–10.
- Preston, A. R., Shohamy, D., Tamminga, C. a, & Wagner, A. D. (2005). Hippocampal function, declarative memory, and schizophrenia: Anatomic and functional neuroimaging considerations. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 5(4), 249–256.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia. *Alzheimers Dis. Int.*, 87p.
- Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The NE J. of Med.*, 362(4) :329–344.
- Qin, S., Colin, C., Hinners, I., Gervais, A., Cheret, C. & Mallat, M. (2006). System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J. Neurosci.* 26, 3345–3356.
- Ransohoff, R. M., & Brown, M. a. (2012). Review series Innate immunity in the central nervous system. *The J. of Clin. Invest.* 122(4), 1164–1171.
- Rao, A. T., Degnan, A. J., & Levy, L. M. (2013). Genetics of Alzheimer Disease. *Am. J. Neuroradiol.* 35(3):457-8.
- Reed-Geaghan, E.G., et al., 2009. CD14 and Toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A{beta}-stimulated microglial activation. *J. Neurosci.* 29(38):11982-92
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.*, 88(4): 640–651.
- Revett, T. J., Baker, G. B., Jhamandas, J., & Kar, S. (2013). Glutamate system, amyloid ?? peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci.*, 38(1), 6–23.
- Rivest, S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat.. Rev. Immunol.*, 9(6), 429–39.

- Rivest, S. (2015). TREM2 enables amyloid β clearance by microglia. *Cell Res.*, 25(5), 535–536.
- Rivest, S. (2011). The promise of anti-inflammatory therapies for CNS injuries & diseases. *Exp. Rev. Neurother.*, 11(6):783-6.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiol. Rev.*, 81(2), 741–767.
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015). Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier Yonatan. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 516(7530), 267–271.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S: Bone marrow- derived microglia play a critical role in restricting senile plaque for- mation in Alzheimer's disease. *Neuron* 161;49(4):489–502
- Sisodia, S. S., & George-Hyslop, P. H. (2002). γ -Secretase, Notch, A β and Alzheimer's Disease : Where Do The Presenilins Fit In ? *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(4)281-90.
- Skokowa, J., Cario, G., Uenal, M., Schambach, A., [...] & Welte, K. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.*, 12(9), 1191–1197.
- Solito, E., & Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Front. Pharma.*, 3 (14), 1–10.
- Sokolowski, J. D., & Mandell, J. W. (2011). Phagocytic clearance in neurodegeneration. *Am. J. Pathol.*, 178(4), 1416–1428.
- Spangenberg, E. E., Lee, R. J., Najafi, A. [...] Green, K. N. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- b pathology. *Brain*, 139(Pt 4)(:1265-81), 1–17
- Tahara, K., Kim, H.-D., Jin, J.-J., Maxwell, J. A., Li, L., & Fukuchi, K. (2006). Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain*, 129(Pt 11), 3006–19.
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M. W., [...] & Lipton, S. a. (2013). A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 110(27), 2518–2527.
- Thériault, P., ElAli, A., & Rivest, S. (2015). The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.*, 7(1):41, 1-10
- Trudler, D., Farfara, D., & Frenkel, D. (2010). Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm.*, 2010(2010), 1–12.
- Udan, M.L., et al., 2008. Toll-like receptors 2 and 4 mediate Abeta(1–42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J. Neurochem.* 104, 524–533.

- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G. Y., and Sun, A. Y. (2005). Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 31, 3–16
- Webster S., Bachstetter A., Nelson P., Schmitt F. & Van Eldik, L. (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet.*, 23(5):88, 1–23
- Wildsmith, K. R., Holley, M., Savage, J. C., Skerrett, R., & Landreth, G. E. (2013). Evidence for impaired amyloid β clearance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.*, 5(33), 1–6.
- Willey, J.M., L.M. Sherwood and C.J. Woolverton, (2008). Prescott, Harley and Kleins's Microbiology. 7th Edn., McGraw-Hill Higher Education, New-York, USA.
- Yan, Riqiang & Vassar, Robert (2014) Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol.* 2014 Mar; 13(3): 319–329.
- Zheng, X. Y., Zhang, H. L., Luo, Q., & Zhu, J. (2011). Kainic acid-induced neurodegenerative model: Potentials and limitations. *J. Biomed. Biotech.*, vol. 2011(2011), 1-10
- Zhong Z, Yang L, Wu X, Huang W, Yan J, [...] Tang X. (2014) Evidences for B6C3-Tg (APP^{swe}/PSEN1^{dE9}) double-transgenic mice between 3 and 10 months as an age-related Alzheimer's disease model. *J. Mol. Neurosci.* 53(3):370-6.