

Etudes biologiques de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire de la maladie d'Alzheimer

Dominique Garin

▶ **To cite this version:**

Dominique Garin. Etudes biologiques de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENS043 . tel-00965541

HAL Id: tel-00965541

https://theses.hal.science/tel-00965541

Submitted on 25 Mar 2014

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Dominique Garin

Thèse dirigée par **Daniel Fagret**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques – INSERM U1039**
dans **l'École Doctorale Ingénierie de la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Etudes biologiques de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire de la maladie d'Alzheimer

Thèse soutenue publiquement le **« 26 Janvier 2012 »**,
devant le jury composé de :

Monsieur Yves CHARNAY
Chargé de recherches aux Hôpitaux Universitaires de Genève, Rapporteur

Monsieur Daniel FAGRET
Professeur et praticien hospitalier au CHU de Grenoble, Membre du jury

Monsieur Julian GARCIA
Professeur de l'Université de Grenoble, Président du jury

Monsieur Didier LE BARS
Maître de conférences et praticien hospitalier au CHU de Lyon, Membre du jury

Madame Marcelle MOULIN-SALLANON
Chargée de recherches INSERM à Grenoble, Membre du jury

Monsieur Pierre PAYOUX
Professeur et praticien hospitalier au CHU de Toulouse, Rapporteur

Remerciements

Ce travail de thèse a été soutenu par le cluster de recherche Handicap, Vieillissement et Neurosciences et la région Rhône Alpes par l'intermédiaire d'une allocation doctorale de recherche.

Je tiens à remercier les professeurs Daniel Fagret et Catherine Ghezzi pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire Radiopharmaceutiques Biocliniques (INSERM U1039) et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci également d'avoir suivi ce travail avec intérêt et de m'avoir guidé pendant ces 5 années passées au laboratoire.

Je tiens à remercier très chaleureusement Marcelle Moulin pour m'avoir formé, encadré et aidé tout au long de ce travail. Merci pour ta gentillesse et ton soutien sans faille.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail. Merci à Yves Charnay et Pierre Payoux d'avoir accepté d'être rapporteur et de juger ce travail. Merci également à Didier Lebars, Julian Garcia, Marcelle Moulin-Sallanon d'avoir accepté de faire partie du jury et examiné ce travail.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont participé à ces travaux et sans qui rien n'aurait pu se faire:

- les membres de l'équipe Radiopharmaceutiques biocliniques et ceux qui y sont passés et qui ont participé à ces travaux: Mitra Ahmadi, Sandrine Martin, Jean Paul Mathieu pour votre travail indispensable sur toute la radiochimie, Laetitia Duhamel pour ton implication sur les vecteurs de traceurs de la protéine Tau, René Bontron pour ton expertise sur les souris 3xTgAD et les bons petits plats du resto-U, Danièle Marti-Battle pour ton aide pour l'évaluation des calixarènes, Marie-Dominique Desruet pour ta rapidité à fournir du ^{99m}Tc, Pascale Perret pour ton aide sur les manips et le manuscrit.
- Martine Demeunynck et Sabine Chierici pour les études sur les COB (Département de Chimie Moléculaire de l'université de Grenoble).
- Julian Garcia, Emilie Dufour, Lisa Moni pour les études sur les radiotraceurs de Tau (Département de Chimie Moléculaire de l'université de Grenoble).
- Monique Touret de l'unité INSERM U842 – Neuro-Oncologie et Neuro-Inflammation (Lyon) pour les études sur les cultures cellulaires neuronales et astrocytaires.

Remerciements

- Michel Dubois-Dauphin du laboratoire de thérapie cellulaire expérimentale de l'université de Genève (Département de pathologie et immunologie) pour ton aide concernant le travail sur coupes en immunohistochimie et en fluorescence.
- les membres du service de neuropsychiatrie des Hôpitaux universitaires de Genève à Chêne-Bourg (Suisse) et notamment Yves Charnay pour votre assistance concernant les souris 3xTgAD et Philippe Millet pour ton aide sur l'imagerie du ^{18}F-FDG.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont accompagné au cours de ces cinq dernières années au sein de l'unité Radiopharmaceutiques Biocliniques et d'ailleurs. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les pintes de bières au pub, les pizzas à la Mandoline, les parties de QPUC ou de Tout le monde veut prendre sa place, les batailles de boulettes… Parce que mine de rien, on s'est bien marré…

Un énorme merci à mes proches, parents et amis, pour avoir toujours été là. Merci Camille pour ton soutien et ton amour.

Sommaire

Liste des abréviations 9
Liste des figures 10
Liste des tableaux 12
Liste de l'ensemble des composés évalués 13
Introduction 14
Revue bibliographique 16
A. Généralités 16
1. La découverte de la maladie d'Alzheimer (MA) 16
2. La maladie d'Alzheimer 16
2.1. Troubles de la mémoire 16
2.2. Troubles instrumentaux 17
2.3. Troubles du comportement 17
2.4. Perte d’autonomie 18
2.5. Evolution relative des troubles neuropsychologiques 18
3. Etiologie 19
3.1. Forme « familiale » de la maladie d'Alzheimer 19
3.2. Forme sporadique de la MA 19
4. Facteurs de risque et facteurs protecteurs 20
4.1. Age 20
4.2. Sexe 20
4.3. Niveau d’éducation 21
4.4. Facteurs de risque vasculaire 21
4.4.1. Hypertension artérielle 22
4.4.2. Dyslipidémie 23
4.4.3. Diabète de type 2 23
4.5. Antécédents familiaux 23
4.6. Facteurs génétiques 24
4.6.1. Apolipoprotéine E 24
4.6.2. Autres facteurs de risques génétiques 24
4.7. Facteurs sociaux et environnementaux 26
5. Prévalence et incidence 27
5.1. Prévalence 27
5.2. Incidence 28
5.3. Limite des données de prévalence et d’incidence 29

5.4. Conclusion sur les données de prévalence et d'incidence 29
6. Problématique de santé publique 30
6.1. Aspects démographiques 30
6.2. Aspects économiques 30
6.2.1. Coût de la MA dans le monde 30
6.2.2. Coût de la MA en France 31
6.2.3. Evolution du coût 32
B. Neuropathologie 32
1. Observations macroscopiques 32
2. Observations microscopiques 32
2.1. La cascade amyloïde 33
2.1.1. Maturation de l'APP 33
2.1.1.1. L'APP 33
2.1.1.2. La voie amyloïdogénique 34
2.1.1.3. La voie non amyloïdogénique 36
2.1.2. La cascade amyloïde 36
2.1.2.1. Description générale de l'hypothèse 36
2.1.2.2. L'agrégation 37
2.1.2.3. Toxicité synaptique 39
2.1.2.4. Atteintes membranaires 39
2.1.2.5. Stress oxydatif 39
2.1.2.6. Inflammation 40
2.1.2.7. Action sur la protéine Tau 41
2.1.3. Topographie des lésions Aβ 42
2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires 43
2.2.1. La protéine Tau 43
2.2.2. Agrégation de la protéine Tau dans la MA 45
2.2.3. La dysfonction de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer 47
2.2.4. Modifications post-transcriptionnelles de la protéine Tau 47
2.2.4.1. Phosphorylation 47
2.2.4.2. Protéolyse partielle 49
2.2.4.3. Glycosylation 49
2.2.4.4. Glycation 49
2.2.4.5. Ubiquitination 50
2.2.5. Topographie des lésions 50
3. Les lésions associées 51

3.1. Perte neuronale 51
3.2. Perte synaptique 52
4. Relations entre dégénérescences neurofibrillaires et agrégats de peptides amyloïdes 52
4.1. Topographie relative des lésions 52
4.2. Synergie Tau/Aβ 53
C. Suivi de l'évolution de la MA 55
1. Diagnostic 55
1.1. Diagnostic probabiliste 55
1.2. Les critères diagnostiques 55
1.3. Spécificité et sensibilité du diagnostic 57
1.4. Retard et sous-diagnostic de la MA 57
1.5. Vers de nouveaux critères diagnostiques 58
1.6. Conclusion 59
2. Le dosage de biomarqueurs 59
2.1. Peptide Aβ 1-42 60
2.2. Protéines Tau totales 60
2.3. Protéines Tau hyperphosphorylées 60
3. L'imagerie 60
3.1. Imagerie par résonance magnétique 61
3.1.1. L'IRM anatomique 61
3.1.2. IRM du tenseur de diffusion 62
3.2. L'imagerie nucléaire 63
3.2.1. Etude fonctionnelle 63
3.2.2. Etude moléculaire 64
3.2.2.1. Marqueurs des peptides amyloïdes 64
3.2.2.1.1. Traceurs utilisés en imagerie TEP 64
3.2.2.1.2. Traceurs utilisés en imagerie TEMP 67
3.2.2.2. Marqueurs des DNF 68
D. Modèles animaux de la MA 69
1. Choix d'un modèle animal de la MA 69
2. Les souris transgéniques comme modèles de la MA 70
2.1. Les souris simple-transgéniques 70
2.2. Les souris double-transgéniques 71
2.3. Les souris triple-transgéniques 71
2.3.1. Les souris 3xTgAD 72
3. Conclusion 74

E. Problématique de recherche et projet mis en place 74
Travail expérimental 77
Partie I: Validation d'un modèle animal de la MA 77
A. Matériels et méthodes 77
1. Conditions d'élevage et d'expérimentation 77
2. Immunohistochimie Aβ et Tau 77
3. Génotypage 79
B. Résultats 80
1. Génotypage 80
2. Histologie des dépôts d'Aβ et des protéines Tau hyperphosphorylées 82
C. Discussion 84
D. Conclusion 86
Partie II: Evaluation de radiotraceurs existants 87
I. Evaluation biologique du ^{99m}Tc-HMPAO 88
A. Matériels et méthodes 88
1. Radiochimie 88
2. Imagerie *in vivo* 88
2.1. Administration des radiotraceurs et anesthésie des animaux 88
2.2. Protocole expérimental *in vivo* du ^{99m}Tc-HMPAO 89
2.3. Acquisition des images 89
2.4. Analyse des images TEMP et quantification 89
3. Analyses *post-mortem* 90
3.1. Préparation des coupes de cerveau de souris 90
3.2. Autoradiographie et analyse des images 90
B. Résultats 91
1. Imagerie *in vivo* de la distribution de ^{99m}Tc-HMPAO 91
2. Autoradiographie des coupes de cerveau après administration de ^{99m}Tc-HMPAO 92
C. Discussion 92
D. Conclusion 93
II. Evaluation biologique du ^{18}F-FDG 94
A. Matériels et méthodes 94
1. Synthèse du ^{18}F-FDG 94
2. Imagerie *in vivo* 94
2.1. Protocole expérimental *in vivo* du ^{18}F-FDG 94
2.2. Acquisition des images 94
2.3. Analyse des images TEP et quantification 94

3. Analyses *post-mortem* 95
B. Résultats 95
1.1. Imagerie *in vivo* du ^{18}F-FDG 95
1.2. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris 96
C. Discussion 97
D. Conclusion 99
III. Evaluation biologique du ^{125}I-IMPY 100
A. Matériels et méthodes 100
1. Radiomarquage et stabilité du radiotraceur 100
1.1. Protocole de radiomarquage 100
1.2. Analyse du ^{125}I-IMPY après radiomarquage 100
1.3. Analyse de stabilité dans le sang et l'urine de souris 101
2. Imagerie *in vivo* 101
2.1. Protocole expérimental *in vivo* du ^{125}I-IMPY 101
2.2. Acquisition, analyse et quantification des images 101
3. Analyses *post-mortem* 101
3.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau de tissu 101
3.2. Biodistribution par prélèvement d'organes 102
B. Résultats 102
1.1. Radiomarquage et stabilité de ^{125}I-IMPY 102
1.2. Biodistribution par prélèvement d'organes 103
1.3. Quantification de l'imagerie planaire *in vivo* 104
1.4. Quantification des images autoradiographiques sur coupes de cerveau dans les zones riches en plaques amyloïdes 105
C. Discussion 106
D. Conclusion 107
Partie III : Développement de nouveaux radiotraceurs pour le suivi de la MA 108
I. Evaluation biologique des para-^{35}S-sulfonato-calix[4]arènes 109
A. Matériels et méthodes 109
1. Synthèse et radiomarquage 109
2. Protocole expérimental pour l'évaluation des ^{35}S-calixarènes. 110
3. Analyses *post-mortem* 110
3.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau 110
3.2. Biodistribution des ^{35}S-calixarènes par prélèvement d'organes 110
B. Résultats 111
1.1. Biodistribution par prélèvement d'organes 111

1.2. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris 113
C. Discussion 113
D. Conclusion 114
II. Evaluation biologique des molécules fluorescentes COB 115
A. Matériels et méthodes 115
1. Description des molécules évaluées 115
2. Protocoles effectués pour l'évaluation des COB 116
3. Synthèse des COB 117
4. Inhibition de la formation des fibres d'amyloïde *in vitro* 118
5. Evaluation des COB sur cultures cellulaires 118
5.1. Culture primaire d'astrocytes 118
5.2. Culture primaire de neurones 119
5.3. Culture de neuroblastomes 119
5.4. Incubation des molécules d'intérêt avec les cultures cellulaires 120
5.5. Histologie 120
5.6. Acquisition et analyse des images 121
6. Evaluation de la liaison des COB sur coupes de cerveau 121
6.1. Préparation des coupes de cerveau de souris 121
6.2. Préparation des coupes de cerveau humain 121
6.3. Incubation des molécules d'intérêt sur coupes de cerveau 121
6.4. Incubation avec la solution contrôle de thioflavine 122
6.5. Acquisition et analyse des images 122
7. Evaluation biologique des COB *in vivo* 122
7.1. Administration des composés 122
7.2. Préparation des coupes de cerveau de souris 123
7.3. Acquisition et analyse des images 123
B. Résultats 123
1.1. Inhibition de la formation des fibres d'Aβ40 *in vitro* 123
1.2. Liaison des COB sur coupes de cerveau de souris 124
1.3. Evaluation biologique des COB *in vivo* 127
1.4. Expériences réalisées en culture cellulaire 128
C. Discussion 130
D. Conclusion 133
III. Evaluation biologique d'un ligand de la protéine Tau : A93 134
A. Matériels et méthodes 134
1. Radiochimie 134

1.1. Principe de la complexation histidine-cœur tricarbonyle 134
1.2. Protocole de radiomarquage 135
1.3. Analyse de la pureté radiochimique 135
1.4. Analyse de la stabilité du peptide A93 *in vivo* chez la souris 136
2. Evaluation de la liaison de A93 sur coupes de cerveau 137
2.1. Préparation des coupes 137
2.2. Incubation 137
2.3. Autoradiographie et analyse des images 137
3. Imagerie *in vivo* 137
3.1. Protocole expérimental pour l'évaluation de A93 *in vivo* 137
3.2. Acquisition des images 138
3.3. Analyse des images TEMP et quantification 138
4. Analyses *post-mortem* 138
4.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau *ex vivo* 138
4.2. Biodistribution par prélèvement d'organes 138
B. Résultats 139
1.1. Radiochimie du composé A93 139
1.2. Analyse de la fixation de A93 aux éléments sanguins 140
1.3. Imagerie *in vivo* de la distribution cérébrale de A93 140
1.4. Imagerie autoradiographique *post mortem* sur coupes de cerveau 141
1.5. Liaison de A93 sur coupes de cerveau de souris 142
1.6. Biodistribution par prélèvement d'organes 143
C. Discussion 143
D. Conclusion 145
IV. Evaluation biologique de vecteurs de peptides : C6 et C3 146
A. Matériels et méthodes 146
1. Radiochimie 146
1.1. Radiomarquage 146
1.2. Analyse de la stabilité de C6 et C3 *in vivo* chez la souris 146
2. Protocole expérimental pour l'évaluation de C6 et C3 *in vivo* 147
3. Analyses *post-mortem* 147
B. Résultats 148
1.1. Radiochimie des vecteurs C6 et C3 148
1.2. Analyse de la répartition des radiotraceurs dans le sang 150
1.3. Evaluation chez la souris Wild-type 151
1.3.1. Biodistribution de C6 et C3 151

1.3.2. Imagerie TEMP *in vivo* de la distribution cérébrale de C6 et C3 152
1.3.3. Quantification de l'activité dans le cerveau par prélèvement de tissu 153
1.3.4. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris 154
1.4. Distribution de C3 dans le cerveau de souris 3xTgAD 155
1.4.1. Activité de C3 dans le cerveau 155
1.4.2. Autoradiographie des coupes de cerveau après administration de C3 156
C. Discussion 158
D. Conclusion 160
Conclusion générale 161
Références bibliographiques 163

Liste des abréviations

3xTgAD : souris triple-transgénique
^{11}C-PiB : Pittsburg compound B marqué au carbone 11
^{125}I-IMPY 6-iodo-2-(4'-diméthylamino)phényl-imidazo[1,2-*a*]-pyridine marqué à l'iode 125
^{18}F-FDDNP 2-(1-{6-[(2-fluoroéthyl)(méthyl)amino]-2-naphthyl}éthylidène) marqué au fluor 18
^{18}F-FDG : 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose marqué au fluor 18
^{99m}Tc-HMPAO hexaméthylpropylène-amineoxime marqué au technétium 99m
Aβ : Peptide béta-amyloïde
AICD : APP IntraCellular Domain ou Domaine intracellulaire de l'APP
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ApoE : Apolipoprotéine E
ApoJ : Apolipoprotéine J
APP: Amyloid Precursor Protein ou précurseur de la protéine amyloïde
BACE1 : βAPP Cleaving Enzyme ou enzyme de clivage de l'APP
BHE : Barrière hématoencéphalique
Bq : Becquerel
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
Cpm: Coups par minutes
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CLU : Clustérine
CR1 : Complement Receptor 1 ou récépteur du complément 1
Da : Daltons
DI : Dose injectée
DNF : Dégénérescences neurofibrillaires
IDE : Insulin degrading enzyme ou enzyme de dégradation de l'insuline
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITD : IRM du tenseur de diffusion
LCR : Liquide céphalo-rachidien
MA : Maladie d'Alzheimer
MMSE : Mini-mental state examination
MT : Microtubule
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
OPEPS: Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé
PA : Plaques amyloïdes
PAF : Paraformaldéhyde
PDKP : Proline Directed Protein Kinases
PHF : Paired Helical Filaments ou paires de filaments hélicoïdaux
p.i. : Post injection
PICALM : Phosphatidyl-Inositol-binding Clatherin Assembly Protein
PRC : Pureté radiochimique
PS1/PS2 : Préséniline 1 ou 2
pTau : Tau phosphorylée ou hyperphosphorylée
RNS : Reactive nitrogen species ou espèce réactive du nitrogène
ROI : Region of interest ou région d'intérêt
ROS : Reactive oxygen species ou espèce réactive de l'oxygène
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positons
WT: Wild-type ou sauvage

Liste des figures

Figure 1: Représentations anatomiques de la région hippocampique et parahippocampique 17
Figure 2: Prévalence de la maladie d'Alzheimer par sexe à partir de 65 ans 20
Figure 3: Action des facteurs de risque vasculaires au cours de la MA 22
Figure 4: Implication des gènes ApoE, CLU, PICALM et CR1 dans le développement de la maladie d'Alzheimer 25
Figure 5: Incidence des démences, de la maladie d'Alzheimer et des démences vasculaires 28
Figure 6: Voie de maturation de l'APP 34
Figure 7: Clivage de l'APP par le complexe γ-sécrétase 35
Figure 8: Hypothèse de la cascade amyloïde 37
Figure 9: Schéma des mécanismes impliqués dans la cascade amyloïde 41
Figure 10: Evolution de la distribution des dépôts amyloïdes chez l'Homme 42
Figure 11: Description des 6 isoformes de la protéine Tau 43
Figure 12: Représentation Schématique de la protéine Tau 44
Figure 13: Agrégation de la protéine Tau et dysfonction des microtubules 46
Figure 14: Balance phosphorylation/déphosphorylation de la protéine Tau 48
Figure 15: Evolution de la distribution des dégénérescences neurofibrillaires dans le tissu cérébral au cours du développement de la maladie d'Alzheimer 51
Figure 16: Action combinée de l'Aβ et des DNF dans la MA 54
Figure 17: Représentation des faisceaux de substances blanches cérébrales 62
Figure 18: Analyse du génotypage des souris pour les gènes PS1 et APP 81
Figure 19: Topographie des lésions amyloïdes et des lésions neurofibrillaires 82
Figure 20: Evolution temporelle des lésions amyloïdes chez la souris 3xTgAD 83
Figure 21: Comparaison du nombre de lésions entre souris 3xTgAD mâles et femelles 84
Figure 22: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{99m}Tc-HMPAO 89
Figure 23: Imagerie cérébrale *in vivo* du ^{99m}Tc-HMPAO chez les souris contrôles et 3xTgAD 91
Figure 24: Quantification des images autoradiographiques du ^{99m}Tc-HMPAO chez les souris contrôles et 3xTgAD 92
Figure 25: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{18}F-FDG 94
Figure 26: Imagerie TEP *in vivo* du ^{18}F-FDG chez les souris contrôles et 3xTgAD 96
Figure 27: Quantification des images autoradiographiques après administration de ^{18}F-FDG chez les souris contrôles et 3xTgAD 97
Figure 28: Représentation schématique du ^{125}I-IMPY 100
Figure 29: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{125}I-IMPY 101
Figure 30: Analyses chromatographiques de ^{125}I-IMPY après marquage et après injection chez l'animal 102

Figure 31: Biodistribution par prélèvement d'organes de ^{125}I-IMPY chez la souris 103
Figure 32: Quantification de l'imagerie planaire de ^{125}I-IMPY 104
Figure 33: Mise en évidence des régions à forte densité de plaques amyloïdes..... 105
Figure 34: Quantification des images autoradiographiques dans les zones riches en plaques amyloïdes 106
Figure 35: Représentation schématique de la structure du para-sulfonato-calix(4)arène..... 109
Figure 36: Protocole expérimental pour le ^{35}S-Calixarène..... 110
Figure 37: Biodistribution des ^{35}S-calixarènes par prélèvement d'organes 112
Figure 38: Voie de synthèse des composés fluorescents..... 118
Figure 39: Inhibition de la formation des fibres d'Aβ40 *in vitro*..... 123
Figure 40: Liaison des dérivés proflavines sur coupes de cerveau de souris 125
Figure 41: Coupes de cerveau de souris transgéniques après administration des COB *in vivo*. 127
Figure 42: Exemple de photos de cultures cellulaires de neurones après incubation avec COB 231, COB 231dim ou IMPY..... 128
Figure 43: Exemples de photos de cellules en culture après incubation avec COB 231..... 129
Figure 44: Principe de radiomarquage via le complexe tricarbonyle..... 135
Figure 45: Protocole pour l'analyse de stabilité de A93 dans le sang de souris 136
Figure 46: Protocole expérimental *in vivo* pour A93 137
Figure 47: Analyse de la pureté du radiomarquage et de la stabilité de A93 *in vivo* 139
Figure 48: Liaison de A93 avec les éléments présents dans le sang 45 minutes après injection du radiotraceur..... 140
Figure 49: Quantification de l'imagerie TEMP *in vivo* dans le cerveau de souris après administration de A93 140
Figure 50: Quantification de l'autoradiographie des coupes de cerveau de souris après injection de A93 141
Figure 51: Quantification de l'autoradiographie après liaison de A93 sur des coupes de cerveau..... 142
Figure 52: Biodistribution par prélèvement d'organes chez la souris après administration de A93.... 143
Figure 53: Protocole expérimental *in vivo* pour C6 et C3 147
Figure 54: Analyse de la pureté du radiomarquage et de la stabilité de C6 et C3 *in vivo* 148
Figure 55: Répartition des radiotraceurs dans le sang..... 150
Figure 56: Biodistribution par prélèvement d'organes après administration de C6 et C3..... 151
Figure 57: Activité de C3 et C6 dans le cerveau mesurée en imagerie TEMP 152
Figure 58: Activité de C3 et C6 dans le cerveau après prélèvement de tissu cérébral 153
Figure 59: Autoradiographie des coupes de cerveau de souris après administration de C3..... 154
Figure 60: Quantification de l'activité dans le cerveau de souris WT et 3xTgAD 5 minutes après administration de C3 156
Figure 61: Autoradiographie de coupes de cerveau de souris injectées avec C3 157

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste de l'ensemble des molécules évaluées 13
Tableau 2 : Données démographiques sur l'évolution du pourcentage des personnes âgées dans la population mondiale 30
Tableau 3 : Coûts de la MA dans le monde en 2010 31
Tableau 4 : Caractéristiques des marqueurs des peptides amyloïdes proposés en imagerie TEP. 65
Tableau 5 : Conditions de PCR pour le génotypage des souris 3xTgAD pour les gènes PS1, APP et Tau. 80
Tableau 6 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque radiotraceur étudié 87
Tableau 7 : Composés évalués pour la mise au point de nouveaux radiotraceurs pour le suivi de la MA 108
Tableau 8 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque radiotraceur étudié 108
Tableau 9 : Evolution de l'activité au cours du temps dans l'urine 113
Tableau 10 : Formules des composés fluorescents étudiés 116
Tableau 11 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque COB évalué 117
Tableau 12 : Récapitulatif des résultats de liaison des COB sur coupes de cerveau 126

Liste de l'ensemble des composés évalués

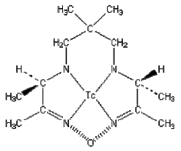
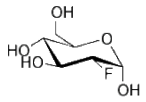
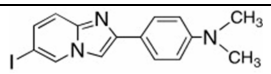
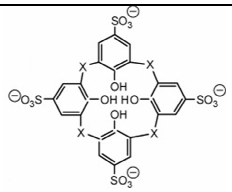
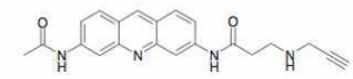
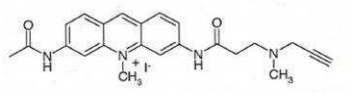
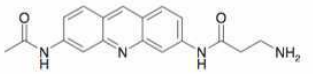
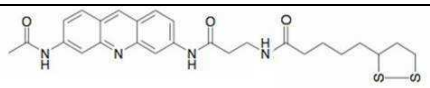
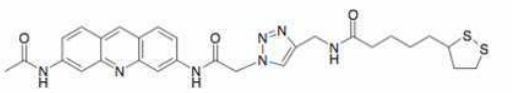
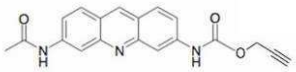
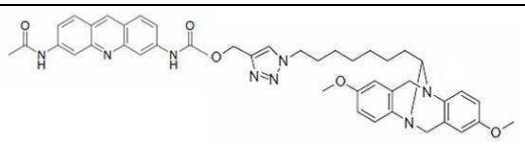
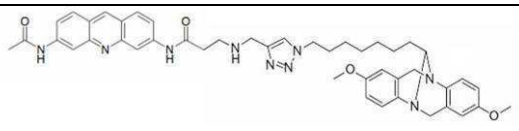
Molécules évaluées	Formules	Cible moléculaire ou fonction visée	Méthode de détection	Pages associées
HMPAO		Débit sanguin cérébral	Radioactivité Isotope: ^{99m}Tc	88 - 93
FDG		Métabolisme du glucose	Radioactivité Isotope: ^{18}F	94 - 99
IMPY		Plaques amyloïdes	Radioactivité: ^{125}I Fluorescence native	100 - 107
Calix(4)arènes		Plaques amyloïdes	Radioactivité Isotope: ^{35}S	109 - 114
COB 231		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 231$_{dim}$		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 232		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 233		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 234		Plaques amyloïdes	Fluorescence native	115 - 133
COB 239		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 252		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
COB 253		Plaques amyloïdes	Fluorescence native du composé	115 - 133
A93	Formule confidentielle	Dégénérescences neurofibrillaires	Radioactivité Isotope: ^{99m}Tc	134 -145
C6	Formule confidentielle	Vecteur peptidique	Radioactivité Isotope: ^{99m}Tc	146 - 160
C3	Formule confidentielle	Vecteur peptidique	Radioactivité Isotope: ^{99m}Tc	146 - 160

Tableau 1 : Liste de l'ensemble des molécules évaluées

Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est la principale pathologie dégénérative du système nerveux. Il s'agit d'un syndrome démentiel qui affecte progressivement les fonctions cognitives et à terme porte atteinte à l'autonomie des patients pour la réalisation des activités quotidiennes. En 2011, 36 millions de personnes seraient atteintes à travers le monde et ce chiffre devrait atteindre 66 millions en 2030. L'augmentation importante du nombre de malades ainsi qu'un coût associé élevé font craindre de fortes difficultés de prise en charge de la MA au cours des prochaines décennies. La MA est, à ce titre, considérée comme un problème majeur de santé publique.

La MA est définie par l'association de troubles cognitifs et mnésiques, et de lésions cérébrales caractéristiques: les plaques amyloïdes (PA) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Le diagnostic de la MA doit rendre compte de ces deux aspects: l'aspect clinique et l'aspect tissulaire. L'examen clinique permet d'évaluer les performances cognitives du patient et donc de réaliser une partie du diagnostic. L'examen anatomo-pathologique, réalisé après le décès du patient, permet de mettre en évidence les lésions tissulaires et ainsi d'établir le diagnostic de la MA avec certitude. Par définition, ce diagnostic n'apporte donc pas de bénéfice sur la prise en charge du patient. Pour pallier ce problème, le diagnostic est établi de façon probabiliste en se basant essentiellement sur le critère clinique.

Les PA sont considérées comme un élément majeur, voire la cause des lésions tissulaires qui se développent au cours de la MA. Cette hypothèse est aujourd'hui controversée en raison de la relation limitée entre la distribution des PA et les symptômes cliniques. A l'inverse, la cinétique d'apparition des DNF est très bien corrélée à l'évolution des troubles psycho-comportementaux ce qui tend à montrer une implication importante des DNF dans la progression de la maladie. Depuis des années, des débats animent la communauté scientifique afin de soutenir l'une ou l'autre hypothèse mais l'incertitude demeure. Le manque évident de connaissances fondamentales sur la physiopathologie de la MA est un élément clé d'appréciation. Si les aspects cognitifs peuvent être suivis de manière efficace grâce à l'examen clinique, le suivi des lésions moléculaires associées à la maladie est plus difficile à réaliser aujourd'hui. L'examen anatomopathologique *post-mortem* permet de caractériser avec précision la nature des lésions tissulaires mais ne considère qu'une image figée de la pathologie. De fait, cet examen reste limité pour comprendre les relations temporelles entre les différentes lésions. La mise au point de techniques de suivi performantes de ces lésions *in*

vivo est un enjeu majeur afin de mieux appréhender les aspects dynamiques de la MA. Ces techniques permettront également d'évaluer l'efficacité des nouvelles thérapies en cours de développement en suivant directement leur impact sur la quantité et l'évolution des lésions tissulaires.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer de nouveaux traceurs pour l'imagerie nucléaire des lésions caractéristiques de la MA, notamment des PA et des DNF, qui permettraient le suivi dynamique *in vivo* de ces lésions au cours du temps.

Afin de réaliser cette étude, nous avons dans un premier temps validé un modèle animal de la maladie d'Alzheimer: la souris transgénique 3xTgAD qui développe des PA et des DNF au cours du vieillissement. Par la suite, nous avons utilisé différents radiotraceurs existants considérés comme outils diagnostiques potentiels de la MA afin de mieux caractériser ce modèle animal. Deux radiotraceurs du métabolisme cérébral (^{18}F-FDG pour le suivi du métabolisme glucidique et ^{99m}Tc-HMPAO pour le suivi du débit sanguin cérébral) et un radiotraceur des PA (^{125}I-IMPY) ont ainsi été évalués. Enfin, nous avons initié le développement de plusieurs nouveaux traceurs des lésions caractéristiques de la MA. D'une part, deux familles de molécules, les para-^{35}S-sulfonato-calix[4]arènes et les COB, ont été évaluées afin de permettre la détection des plaques amyloïdes. D'autre part, un peptide linéaire, A93, ainsi qu'un vecteur de ce peptide ont été développés afin de permettre le suivi des dégénérescences neurofibrillaires.

Revue bibliographique

A. Généralités

1. La découverte de la maladie d'Alzheimer (MA)

Jusqu'au début du XXème siècle, la démence du sujet âgé était considérée par tous les psychiatres comme une conséquence normale du vieillissement. En 1901, Aloïs Alzheimer, neuropsychologue à Francfort, admet comme patiente Auguste D, une personne âgée de 51 ans présentant des symptômes de démence sénile : perte de mémoire progressive, symptômes focaux, délusions et hallucinations. Cinq ans plus tard, à la mort d'Auguste D, Alzheimer réalise des analyses sur des prélèvements de tissu cérébral grâce aux nouvelles méthodes de coloration et d'imprégnation argentiques. Il met en évidence pour la première fois la présence conjointe de lésions connues caractéristiques de la démence sénile, les plaques séniles, et de lésions jusqu'alors inconnues caractérisées par des amas anormaux de fibrilles à l'intérieur des neurones : les dégénérescences neurofibrillaires (Alzheimer 1907). Ce n'est qu'en 1910 qu'Emil Kraepelin donne un nom à cette pathologie : la maladie d'Alzheimer (Kraepelin 1910).

2. La maladie d'Alzheimer

La MA est une démence d'évolution chronique et lente. La progression de la maladie se caractérise par des troubles de la mémoire, de la cognition et des fonctions exécutives et instrumentales. Au stade pré-démentiel, les symptômes sont légers et intermittents, pouvant facilement passer inaperçus tels qu'une incapacité à faire différentes activités de manière simultanée. Au stade démentiel puis terminal, ces symptômes s'accroissent progressivement faisant passer l'individu d'un état d'autonomie complète à un état de dépendance avancée.

2.1. Troubles de la mémoire

Les troubles de la mémoire constituent les symptômes les plus marqués au cours du développement de la MA. Ce sont en général les premiers signes remarquables de la maladie. Dans un premier temps, la mémoire à court terme est affectée. Ainsi le malade peut avoir des difficultés à se rappeler d'événements qui viennent de se produire mais se souvient encore relativement bien d'événements d'un passé lointain. Au cours du développement de la maladie, l'altération mnésique est de plus en plus importante et agit de manière rétrograde en altérant progressivement les souvenirs plus anciens.

Les troubles de la MA concernent principalement et dans un premier temps la mémoire « épisodique » à court terme. Ce type de mémoire permet d'enregistrer, stocker et récupérer des événements vécus personnellement et participe ainsi à la construction de l'identité à partir d'événements autobiographiques. L'altération de ce type de mémoire peut s'expliquer par l'atteinte neurofibrillaire de la région hippocampique et parahippocampique (Figure 1) dans les stades précoces de la MA. La mémoire sémantique (mots, concepts et connaissances générales) est en général atteinte plus tardivement. Ce type de mémoire est relié d'un point de vue anatomique aux aires temporales qui sont également affectées de manière importante par les lésions de type neurofibrillaire.

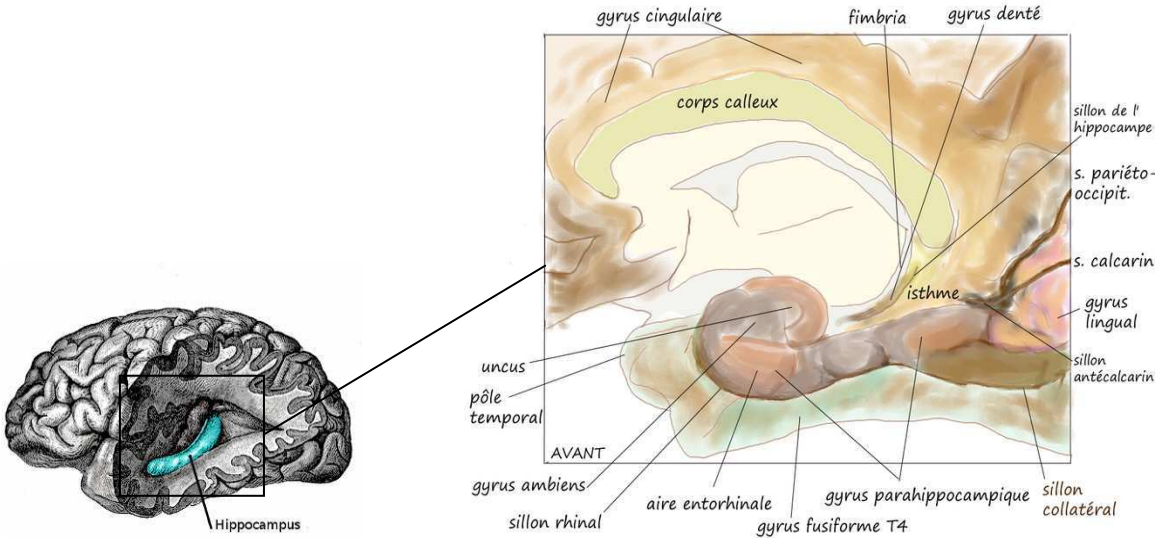


Figure 1: Représentations anatomiques de la région hippocampique et parahippocampique
Image de gauche d'après Gray 1858, image de droite d'après Di Marino 2010.

2.2. Troubles instrumentaux

Les troubles instrumentaux sont présents dès le début de la MA, notamment les troubles du langage. Le patient atteint de la MA présente des difficultés à trouver le mot juste pour désigner un objet. L'expression écrite est souvent plus précocement atteinte que l'expression orale. La désorientation et des troubles de l'attention peuvent également survenir de manière précoce. L'apraxie (difficulté à exécuter certains gestes) et l'agnosie (difficulté à reconnaître des objets) se développent plus tardivement.

2.3. Troubles du comportement

Les troubles du comportement sont des symptômes très fréquents chez les malades atteints de la MA. Ces symptômes peuvent être de natures très diverses : troubles de l'humeur (dépression, apathie, euphorie), troubles psychotiques (hallucinations, délire), troubles

végétatifs (sommeil, appétit), troubles moteurs (mouvements aberrants), modifications de l'agressivité et de l'agitation. Le patient présente fréquemment une perte d'initiative et de motivation, un désintérêt pour les passe-temps et les relations sociales.

2.4. Perte d'autonomie

La MA s'accompagne d'une perte progressive d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne jusqu'à un stade de dépendance totale. Cet élément d'appréciation est capital car il conditionne toute la prise en charge du patient. Le besoin d'assistance est croissant pour les patients qui voient leurs capacités cognitives décliner et qui ont des difficultés à effectuer les gestes du quotidien.

2.5. Evolution relative des troubles neuropsychologiques

Au stade pré-démentiel, ce sont essentiellement les troubles cognitifs qui portent préjudice au patient. Ces troubles sont légers et peuvent passer inaperçus tant ces signes sont communs dans la population générale : oubli d'un nom ou d'un mot, perte d'un objet… Les troubles comportementaux tels que l'irritabilité peuvent alors s'expliquer par de multiples facteurs.

La maladie évolue progressivement en 5 à 10 ans pour atteindre le stade démentiel. Au cours de cette période, il y a une aggravation marquée des troubles de la mémoire avec une impossibilité de faire appel à la mémoire à court terme. Les souvenirs lointains restent épargnés au moins dans un premier temps. Les troubles du langage s'accentuent progressivement. Le patient commence à avoir des difficultés à exécuter certains gestes, à coordonner ses mouvements et des difficultés à reconnaître des objets ou des personnes. Les troubles comportementaux se développent entraînant une désocialisation. Les conduites élémentaires commencent à être touchées : troubles de l'alimentation et de l'hydratation, troubles du sommeil.

Dans les stades sévères de la pathologie, le patient atteint de la MA se dirige vers un état de dépendance totale. La perte de mémoire atteint la mémoire de façon rétrograde. Les souvenirs récents sont touchés puis progressivement les souvenirs plus anciens sont perdus. Le malade ne reconnaît plus ni ses proches ni son environnement. Les taches élémentaires ne sont plus assurées : alimentation, hydratation, marche. Bien que considérée comme non létale, la perte progressive d'autonomie mène le patient dans un état avancé de fragilité qui influe sur l'espérance de vie.

3. Etiologie

Selon l'étiologie de la maladie, on en distingue deux formes distinctes : une forme dite « familiale » d'origine génétique et une forme dite « sporadique » d'origine multiple et inconnue.

3.1. Forme « familiale » de la maladie d'Alzheimer

Certaines personnes sont porteuses de mutations génétiques induisant un développement précoce de la MA (avant 65 ans). On parle alors de forme « familiale » ou « génétique » ou encore de « forme précoce » de la MA. Le nombre de cas d'origine génétique est très minoritaire. Ces patients représenteraient environ 1% de la totalité des cas de MA (Campion 1999). La première mutation génétique concernant une forme familiale de la MA a été découverte en 1991 sur le gène du précurseur de la protéine amyloïde (APP pour Amyloid Precursor Protein) situé sur le chromosome 21 (Goate 1991). Depuis, de nombreuses autres mutations ont été mises en évidence, la plupart concernant des gènes liés au métabolisme du peptide β-amyloïde, composante majeure des plaques séniles. Trois gènes sont principalement mis en cause dans ces formes familiales: les gènes codant l'APP, la préséniline 1 (PS1) et la préséniline 2 (PS2). Le rôle de ces trois gènes sera décrit ultérieurement dans ce manuscrit, cependant il faut retenir que les modifications liées à la duplication de gènes ou aux mutations entraîneraient une surproduction de peptide amyloïde, néfaste pour le tissu cérébral (Hardy 1997).

On recense à ce jour 23 mutations sur le gène de l'APP, toutes placées à proximité des sites de clivages de l'APP par les sécrétases. En plus de ces mutations ponctuelles, le gène de l'APP se trouve dupliqué dans un certain nombre de cas. Les gènes PS1 et PS2 sont respectivement situés sur les chromosomes 14 et 1. 93 mutations du gène PS1 et 12 mutations du gène PS2 ont été décrites à ce jour (http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre). Une étude menée en 2005 sur 65 familles françaises atteintes de formes génétiques de la MA a montré que 66% des cas étaient dus à des mutations du gène PS1, 15% à des mutations du gène APP, 8% à des duplications du gène APP et 11% restent d'origine inconnue (Raux 2005).

3.2. Forme sporadique de la MA

Contrairement aux formes génétiques, les formes sporadiques de la MA se déclarent de façon plus tardive, c'est-à-dire après l'âge de 65 ans. Elles représentent plus de 95% des cas de MA (Campion 1999). Leur origine n'est pas clairement établie, cependant plusieurs facteurs de

risque ont été mis en évidence : l'âge, le sexe, le niveau d'éducation, les facteurs génétiques ou encore certaines pathologies associées.

4. Facteurs de risque et facteurs protecteurs

4.1. Age

L'âge est le principal facteur de risque de la MA. La prévalence des démences augmente considérablement avec l'âge (Figure 2). Avant 65 ans, la prévalence est estimée entre 0,041% (Campion 1999) et 0,2% (Lobo 2000 -étude Eurodem 1991). Ces chiffres augmentent considérablement en fonction de la tranche d'âge considérée jusqu'à atteindre 38,4% pour les femmes âgées de plus de 85 ans.

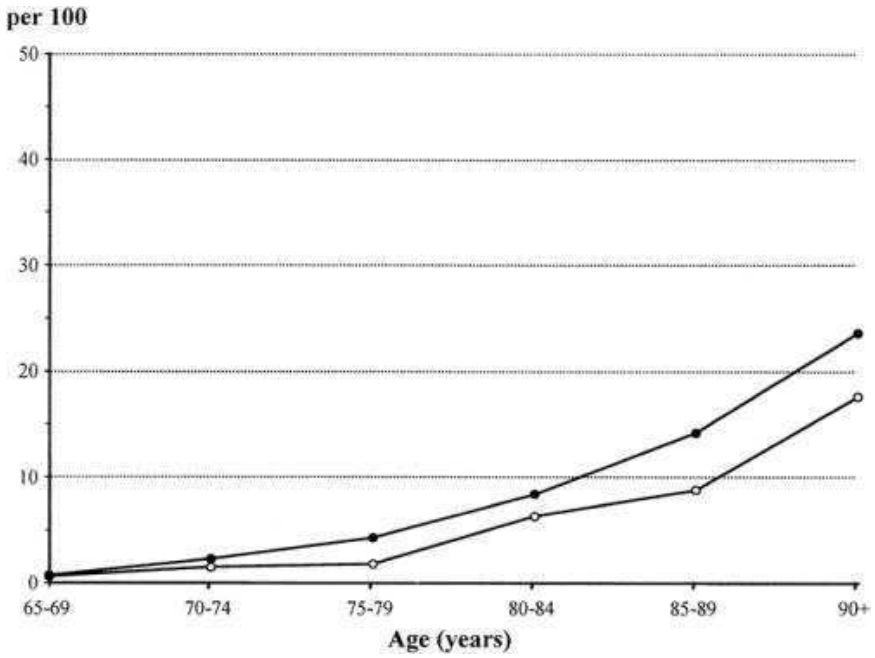


Figure 2: Prévalence de la maladie d'Alzheimer par sexe à partir de 65 ans

En rond blanc, la prévalence chez les hommes; en rond noir, la prévalence chez les femmes. D'après Lobo 2000.

4.2. Sexe

La prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Figure 2). D'une part, la population féminine de plus de 65 ans est plus nombreuse que la population masculine : 6 178 835 femmes contre 4 295 636 hommes (Données de l'INSEE en 2007). D'autre part les femmes sont plus vulnérables que les hommes face à cette affection: la prévalence est de 20,5% pour les femmes contre 13,2% pour les hommes. En prenant en compte l'espérance de vie plus longue des femmes, on estime que le risque relatif des femmes de développer une MA est 1,5 à 2 fois plus important que celui des hommes (Touchon 2002).

Cette observation peut être liée à différents facteurs. La durée de la maladie serait plus longue chez les femmes que chez les hommes. Larson *et al.* ont suivi 500 cas incidents de MA pendant 5 ans et ont mis en évidence une médiane de survie de 4,2 ans chez les hommes et 5,7 ans chez les femmes (Larson 2004). Le rôle de facteurs hormonaux est souvent cité (Casadesus 2008). Un déficit en œstrogènes chez les femmes âgées aurait un effet délétère alors que la production d'androgènes chez les hommes aurait un effet protecteur. Un niveau d'éducation généralement inférieur chez les femmes surtout chez les femmes âgées de plus de 65 ans pourrait également expliquer cette disparité.

4.3. Niveau d'éducation

Un niveau d'éducation élevé pourrait contribuer à diminuer le risque de développer une MA (Letenneur 2000). Au contraire un niveau d'éducation faible augmenterait le risque de développer une démence (Ott 1995). L'évaluation du niveau d'éducation en tant que facteur de risque de la MA est difficile à réaliser. En effet la relation entre niveau d'éducation et MA pourrait être faussée par une plus grande capacité de réserve cérébrale des personnes ayant un niveau d'éducation plus élevé, ce qui leur permettrait de mieux réussir les tests neuropsychologiques retardant ainsi le diagnostic (Letenneur 2000). Ces personnes pourraient donc présenter une atteinte lésionnelle comparable aux personnes ayant un bas niveau d'éducation mais seraient capable de retarder les manifestations cliniques de la maladie par des mécanismes compensatoires.

4.4. Facteurs de risque vasculaire

Ecartés des critères de diagnostic de MA dans les années 1980, les facteurs de risque vasculaire tels que la pression artérielle, la dyslipidémie ou le diabète prennent aujourd'hui une place considérable (Luchsinger 2004).

L'hypothèse vasculaire suggère que l'hypo-perfusion cérébrale induit un découplage entre l'apport de nutriments via le flux sanguin et la demande métabolique cérébrale. Ce manque en nutriments crée un état de crise énergétique à l'origine de toutes les autres observations réalisées au cours de la MA (Figure 3). L'hypo-perfusion cérébrale apparaît généralement au cours du vieillissement et est aggravée en présence de facteurs de risque cardiovasculaires.

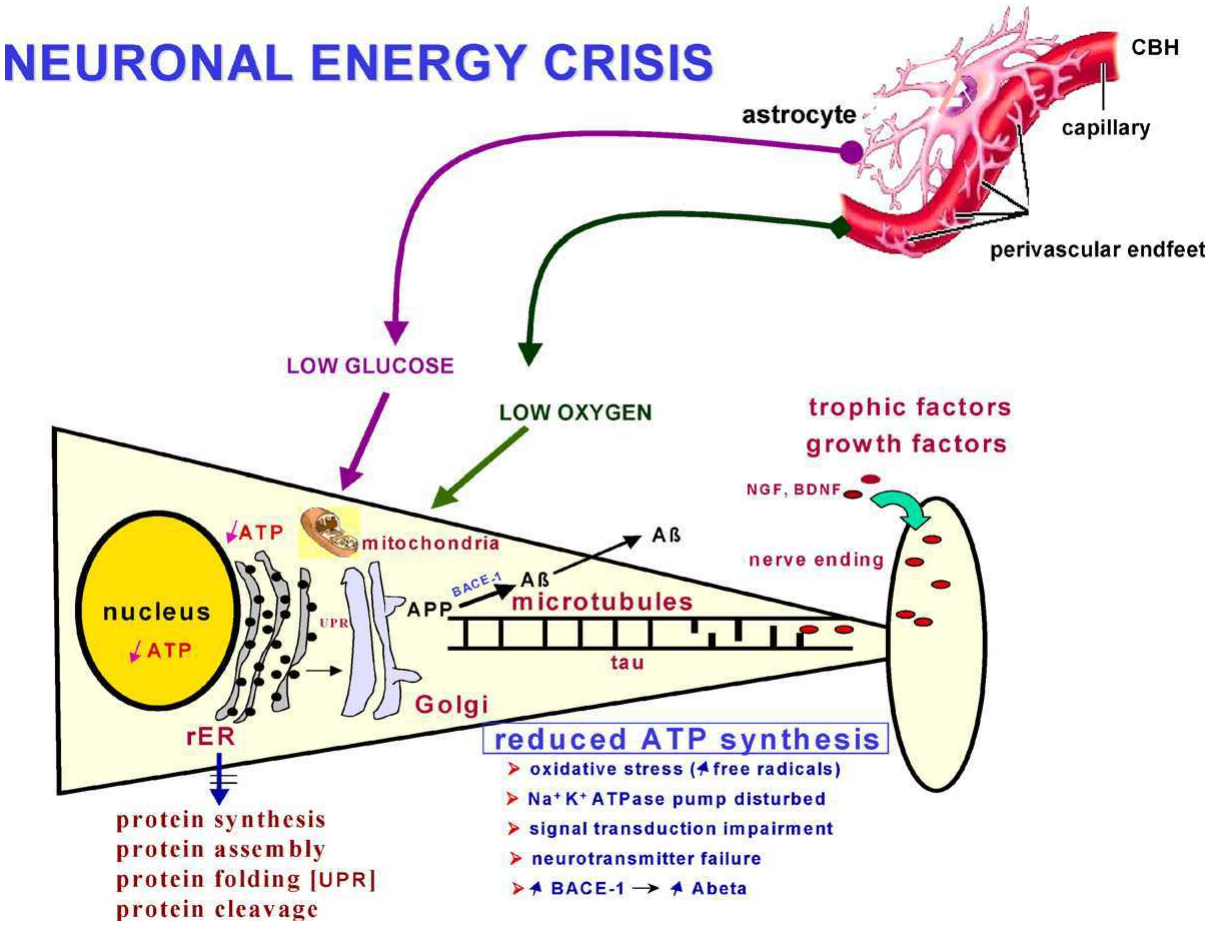


Figure 3: Action des facteurs de risque vasculaires au cours de la MA

Le découplage de l'apport en nutriments par rapport aux besoins entraîne une crise énergétique participant à la physiopathologie de la MA.

4.4.1. Hypertension artérielle

En 2000, Petrovitch *et al*. (Petrovitch 2000) ont montré l'existence d'une relation entre hypertension artérielle et lésions cérébrales caractéristiques de la MA (atrophie cérébrale, PA et DNF). Une augmentation des pressions artérielles systolique (>160mmHG) et diastolique (>95mmHg) en milieu de vie est associée à un plus grand nombre de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires dans l'hippocampe. L'influence de la pression artérielle sur l'apparition des démences semble dépendre du moment de la vie considéré : en milieu de vie, le risque serait augmenté en cas d'hypertension tandis qu'en fin de vie le risque serait augmenté en cas d'hypotension. Plusieurs études ont montré une association entre une augmentation de la pression artérielle en milieu de vie et le développement d'un syndrome démentiel ou à minima d'un déclin cognitif (Qiu 2005). La mise en œuvre d'un traitement anti-hypertenseur pourrait permettre de prévenir partiellement les atteintes cognitives (Semplicini 2005).

4.4.2. Dyslipidémie

L'hypercholestérolémie pourrait jouer un rôle dans la formation des plaques amyloïdes (Sambarmuti 2004). Cependant les tentatives de réduction des taux de cholestérol par l'emploi de statines n'ont pas permis d'influer sur le déclin des fonctions cognitives (Sparks 2005).

4.4.3. Diabète de type 2

Moins évident que certains facteurs de risque comme l'âge ou l'allèle ApoE4, l'hypothèse d'un lien entre diabète de type 2 et MA est cependant souvent mise en avant. Biessels *et al.* (Biessels 2006) ont effectué une revue systématique de la littérature concernant les études prospectives portant sur le lien entre diabète et MA. Sur treize études recensées, huit études mettent en évidence un lien entre les deux pathologies. Une étude similaire menée par Kopf et Frolich (Kopf 2009) indique que quatre études sur onze mettent en évidence un lien entre diabète de type 2 et MA. Sur le plan physiologique, de nombreux mécanismes potentiels ont été décrits pouvant établir un lien entre ces deux pathologies: une diminution du métabolisme glucidique cérébral, une modification de la perméabilité et de la signalisation de l'insuline dans le tissu cérébral, une augmentation de l'inflammation par l'effet direct de l'insuline sur la production de facteurs pro-inflammatoires ou encore une dérégulation de la production ou de la dégradation du peptide Aβ notamment par le biais de l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE pour Insulin Degrading Enzyme). Certains auteurs voient un lien très étroit entre diabète et MA et n'hésitent plus à parler de "diabète de type 3" (Steen 2005).

4.5. Antécédents familiaux

Le fait d'avoir un parent proche atteint de la maladie d'Alzheimer pourrait augmenter le risque de développer une MA. Dans une étude portant sur 1 694 patients atteints de la MA et 12 971 de leurs parents au premier degré, Lautenschlager *et al.* (Lautenschlager 1996) ont montré que le risque de développer la MA était plus important chez les enfants de parents atteints tous deux de la pathologie par rapport à ceux qui n'avaient qu'un parent atteint et ceux dont les deux parents n'avaient pas la MA. De plus, l'âge auquel survient la maladie est plus précoce chez les patients ayant pas des antécédents familiaux de MA. Mosconi *et al.* proposent que cet effet familial provient majoritairement du coté maternel (Mosconi 2010). Cette étude montre, par imagerie nucléaire, que les enfants dont la mère est atteinte de la MA présentent une diminution de la consommation cérébrale de glucose semblable à celle observée chez les

patients atteints de la MA. Ce profil d'hypo-métabolisme glucidique ne se retrouve pas chez les enfants dont le père est atteint de la MA.

4.6. Facteurs génétiques

4.6.1. Apolipoprotéine E

L'apolipoprotéine E est une glycoprotéine impliquée dans le transport du cholestérol et dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Le gène de l'ApoE est localisé sur le chromosome 19 et présente trois allèles majeurs dans la population. Ces allèles, nommés E2, E3 et E4, se distinguent par la présence d'acides aminés différents au niveau des codons 112 et 158. Les isoformes produites sont respectivement appelées: ApoE2, ApoE3 et ApoE4. L'ApoE3 est l'isoforme la plus représentée dans la population (80%) suivie par les isoformes ApoE4 (12%) et ApoE2 (8%).

L'expression de l'allèle E4 est un facteur de risque de la MA. En effet, dans les formes familiales tardives de la MA, 40% des patients sont porteurs de cet allèle (Brousseau 1994). Dans les formes sporadiques de la maladie, le nombre de copies de l'allèle E4 est lié au risque de développement de la MA (Farrer 1997) et à l'âge de début de la MA (Corder 1995). Le risque relatif lié à l'allèle E4 dépend fortement de l'ethnie, du sexe et de l'âge. Chez les personnes âgées de plus de 70 ans, le risque relatif lié à l'allèle E4 disparaît. Les femmes semblent plus affectées par ce facteur de risque. De même certaines populations sont plus susceptibles de développer une MA en ayant cet allèle. Par exemple, les Japonais semblent plus affectés que d'autres populations.

Le mode d'action de l'ApoE4 dans la MA reste encore incompris. L'apoE4 est retrouvée dans les deux lésions principales de la MA: les plaques amyloïdes et les DNF (Namba 1991). L'expression de l'allèle E4 est corrélée à une augmentation du nombre de dépôts amyloïdes dans le cerveau de sujets sains et de patients atteints de la MA (Berr 2001). Il a également été montré que l'ApoE pouvait jouer un rôle dans la voie neurofibrillaire notamment en interagissant directement avec les protéines Tau, composantes majeures des dégénérescences neurofibrillaires (Roses 1996).

4.6.2. Autres facteurs de risques génétiques

L'importance de l'association entre MA et ApoE4 a pendant longtemps éclipsé toutes les autres associations qui pouvaient être évoquées lors des études des composantes génétiques de la pathologie. Plus de 35 gènes ont été désignés comme gènes candidats en tant que facteurs de risque de la MA. Cependant les associations mises en évidence restaient toujours très

faibles par rapport à la forte association de l'apoE et aucun de ces gènes n'a été admis comme facteur de risque véritable de la MA. Récemment, deux études d'association sur le génome entier (GWAS pour Genome-Wide Association Study) regroupant plus de 16 000 sujets ont mis en évidence une association forte entre trois nouveaux gènes et la MA (Lambert 2009 et Harold 2009). Les gènes de la clustérine (CLU), de la Phosphatidyl-Inositol-binding Clatherin Assembly Protein (PICALM) et du Complement Receptor 1 (CR1) sont aujourd'hui les gènes ayant montré la plus forte association avec la MA après le gène de l'ApoE.
Ces trois gènes sont associés à la MA sur le plan génétique mais leur mode d'action reste encore incertain et plusieurs hypothèses ont été émises (Figure 4).

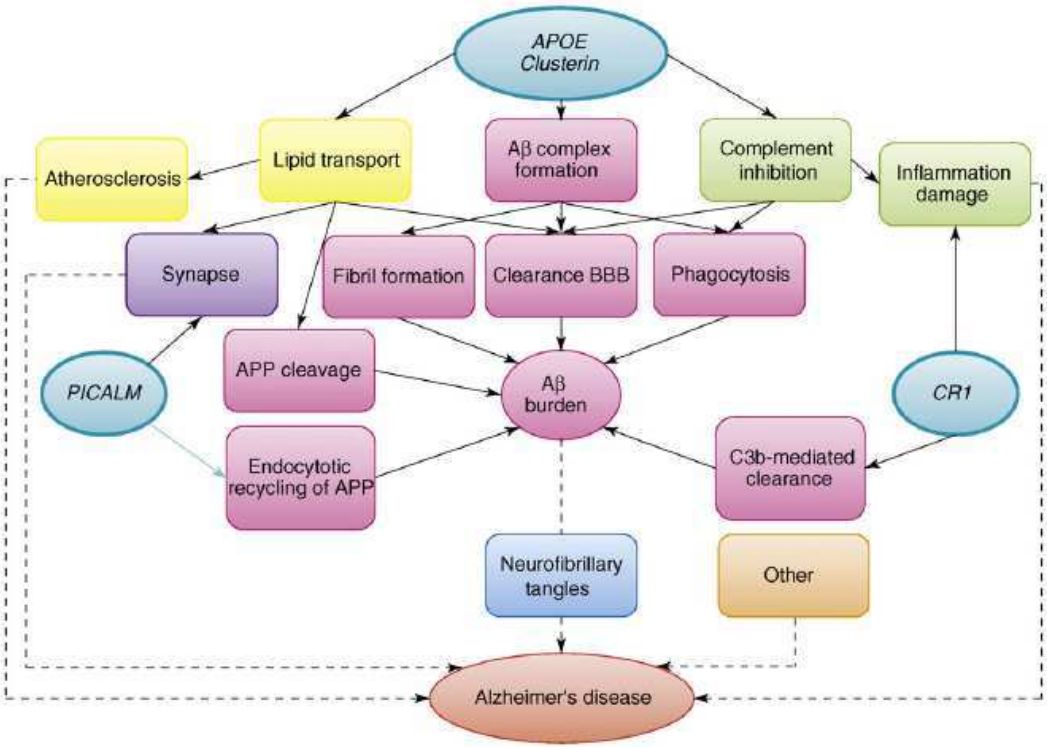


Figure 4: Implication des gènes ApoE, CLU, PICALM et CR1 dans le développement de la maladie d'Alzheimer

L'implication des gènes ApoE, clustérine (CLU), Phosphatidyl-Inositol-binding Clatherin Assembly Protein (PICALM) et Complement Receptor 1 (CR1) est mise en évidence dans la cascade physiopathologique liée à la MA. D'après Sleegers 2010.

Le gène CLU code une protéine appelée clustérine ou apolipoprotéine J (ApoJ). Le lien entre ce gène et le développement de la MA est retrouvé dans les deux études GWAS précitées, ce qui souligne une relation potentiellement forte avec la pathologie. D'un point de vue physiopathologique, CLU pourrait agir selon différentes voies. Il existe une homologie forte entre ApoE et ApoJ. L'ApoJ est la deuxième apolipoprotéine dans le cerveau après l'ApoE. Les deux protéines sont impliquées dans le transport des phospholipides et du cholestérol. Des

polymorphismes de CLU ont été associés à des modifications du taux de lipides et au rapport de l'épaisseur intima-média au niveau de la carotide, ce qui laisse penser que CLU serait impliqué dans la physiopathologie de la MA via la voie vasculaire. De plus, la clustérine est une molécule chaperonne qui peut se lier à de nombreux ligands avec une spécificité relativement faible grâce à son domaine globulaire de fusion. Parmi ces ligands, on retrouve des lipides et des facteurs du complément mais également le peptide Aβ. Par cette liaison, CLU pourrait agir sur la fibrillogenèse de l'Aβ extracellulaire et son élimination en augmentant l'endocytose ainsi que le passage du peptide au travers de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Sleegers 2010).

Le gène PICALM code une protéine jouant un rôle important dans l'endocytose médiée par le système des clathrines. Une défaillance de ce système d'endocytose pourrait modifier la formation des vésicules présynaptiques, leur trafic à l'intérieur du neurone et leur libération dans la fente synaptique. La diminution de l'activité de PICALM dans des cultures embryonnaires de neurones hippocampiques induit une altération morphologique des synapses, une diminution de l'endocytose et une altération de l'activité sécrétoire des synapses (Bushlin 2008).

Le gène CR1 code une protéine du système du complément: le récepteur du complément de type 1. Cette protéine joue un rôle important dans la régulation de la cascade du complément et dans l'élimination des complexes immuns notamment les complexes issus de l'opsonisation via les composants C3b et C4b du complément. Sur le plan physiopathologique, l'association de CR1 avec la MA reste encore mal comprise. L'Aβ pourrait se lier au composant C3b du complément et être éliminé par les érythrocytes porteurs du récepteur CR1 (Rogers 2006). L'une des hypothèses avancées est donc qu'une modification de l'activité de CR1 pourrait altérer l'élimination de ce complexe et donc conduire à une accumulation de peptide Aβ.

4.7. Facteurs sociaux et environnementaux

La consommation de tabac induit une baisse des performances cognitives et un risque accru de développer une MA de manière dose dépendante (Ott 2004, Juan 2004).

La consommation d'alcool de façon modérée semble avoir des effets protecteurs concernant la MA (Letenneur 2004). Les raisons de cet effet protecteur sont encore floues. L'action directe de certains composés contenus dans les boissons alcoolisées comme les flavonoïdes du vin a été évoquée (Savaskan 2003). Les effets bénéfiques de la consommation modérée d'alcool sur les facteurs de risque cardiovasculaires pourraient également agir de manière indirecte sur le risque de développer une démence.

L'exercice physique a un effet protecteur sur le déclin cognitif (Weuve 2004) et sur la survenue d'une MA en particulier (Larson 2006).
De nombreuses études ont montré un lien entre le risque de développement d'une MA et le comportement social (Fratiglioni 2004, pour revue). Un réseau social développé diminue le risque de MA. La richesse du réseau social pourrait influencer la relation entre la sévérité des lésions anatomo-pathologiques et le niveau des performances cognitives (Bennett 2006).
La pratique d'activités sociales de loisirs telles que la lecture, le jeu, le jardinage, la danse, le bricolage ou les voyages diminue le risque de MA (Fabrigoule 2002). A l'inverse les activités moins stimulantes comme le visionnage de la télévision semblent augmenter le risque de survenue d'une démence (Wang 2006).

5. Prévalence et incidence

5.1. Prévalence

La prévalence de la MA ne cesse d'augmenter. Une meilleure connaissance de la pathologie, le vieillissement global de la population et une meilleure sensibilisation au diagnostic des personnels de santé et de la population générale sont autant de facteurs qui influencent fortement l'augmentation de cette prévalence.
Au niveau mondial, une méta-analyse parue en 2005 faisait état de 24,3 millions de personnes atteintes de démences avec 4,6 millions de nouveaux cas par an (Ferri, 2005). D'après cette même étude, si l'on se base sur des taux de mortalité et d'incidence constants, le nombre de cas pourrait doubler tous les 20 ans pour atteindre 80 millions de malades en 2040.
D'autres études ont mis en évidence des chiffres similaires. Wimo *et al.* en 2003 faisaient une estimation de 25 millions de cas en 2000 et prévoyaient 114 millions de malades à travers le monde en 2050. En 2007, Brookmeyer *et al.* ont estimé la prévalence de la MA en essayant de prendre en compte les changements potentiels dans la prévention et le traitement d'ici 2050. Cette étude suggère que le nombre de patients atteints de la maladie d'Alzheimer pourrait quadrupler dans cette même période, passant de 26 à 106 millions de cas, soit 1 individu sur 85 atteint de la MA en 2050. Certaines études sont encore plus pessimistes sur le nombre de cas. Ainsi, la fédération internationale des associations en relation avec la MA, l'Alzheimer's Disease International, estimait le nombre de malades à 35,6 millions en 2010, soit environ 10 millions de personnes atteintes de la MA en plus par rapport à l'étude de Brookmeyer de 2007 (Alzheimer's Disease International 2010).
En France, la source principale de données de prévalence et d'incidence est l'étude PAQUID (pour QUID des Personnes Agées) menée depuis 1989 en Gironde et Dordogne chez des

sujets âgés de plus de 65 ans. En 1989, la prévalence des démences chez les personnes âgées de plus de 75 ans était de 7,7%. Dix ans plus tard, dans cette même cohorte et cette même tranche d'âge, la prévalence était estimée à 17,8%. D'après le dernier recensement effectué en 2007, il y aurait donc environ 950 000 personnes démentes âgées de plus de 75 ans en France dont environ 665 000 cas d'Alzheimer.

La prévalence de la MA devrait surtout augmenter dans les régions en voie de développement. L'amélioration des conditions sociales et sanitaires dans ces pays devrait logiquement réduire la mortalité et faire augmenter la prévalence de la MA. En 2010, 57,7% des patients atteints de la MA se trouveraient dans des pays en voie de développement. Ce pourcentage pourrait être de 70,5% en 2050 (Rapport de l'Alzheimer's Disease international 2009).

5.2. Incidence

Comme la prévalence, l'incidence des démences augmente fortement avec l'âge. D'après les données de l'étude Eurodem (Fratiglioni 2000), l'incidence des démences passe de 2/1000 personnes/an entre 65 et 69 ans à 70/1000 personnes/an pour les plus de 90 ans (Figure 5). En France, d'après l'étude PAQUID, il y aurait 225 000 nouveaux cas de démences par an.

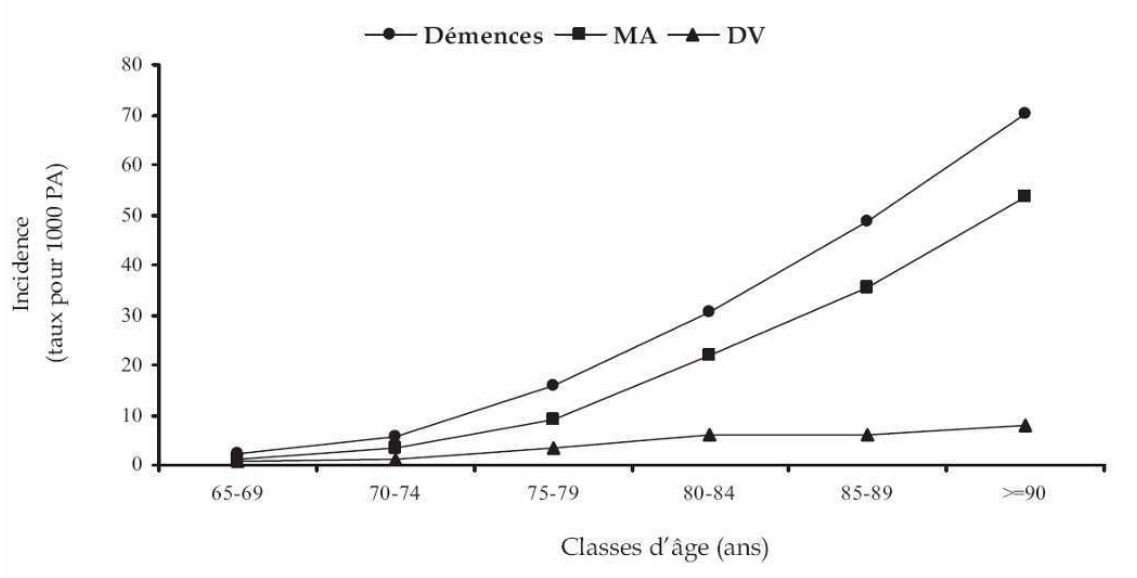


Figure 5: Incidence des démences, de la maladie d'Alzheimer et des démences vasculaires

D'après Fratiglioni 2000. Données issues de l'étude Eurodem. Incidence en nombre de nouveaux cas par an pour 1000 personnes par tranche d'âge à partir de 65 ans. MA: maladie d'Alzheimer, DV: démences vasculaire; PA: personnes/ an.

Certains auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'incidence au cours du temps. Ainsi Rocca *et al.* ont montré une augmentation de l'incidence des démences chez les personnes âgées de plus de 85 ans entre 1960 et 1984 (Rocca 1998). Plus récemment, Ukraintseva a montré une augmentation de l'incidence des démences de 62/1000 entre 1984 et 1990 à 92/1000 personnes/an entre 1991 et 2000 (Ukraintseva 2006). Cependant ces observations ne sont pas forcément significatives d'une augmentation réelle de l'incidence des démences. Il pourrait s'agir d'un biais dû notamment à l'amélioration du diagnostic et de la reconnaissance de la maladie par les personnels de santé et par la population générale.

5.3. Limite des données de prévalence et d'incidence

Bien que de nombreuses études aient été réalisées dans ce domaine, les données de prévalence et d'incidence de la MA restent incertaines. En général, les études d'épidémiologie prennent indifféremment en compte toutes les formes de démences. Le nombre de cas de MA est alors estimé en considérant que 70% des cas de démences sont des patients atteints de la MA (Lobo 2000). La fiabilité du diagnostic est également un point d'approximation important dans ces calculs. On estime aujourd'hui que seul un cas de MA sur deux est diagnostiqué (Tyas 2006). De plus, le diagnostic ne rend pas compte de manière homogène de la sévérité de la pathologie : la majorité des cas diagnostiqués sont des sujets atteints d'une MA déjà bien développée. Le nombre de patients à des stades précoces, présentant des symptômes de la maladie peu marqués, et le nombre de personnes âgées atteintes de plusieurs pathologies, pour lesquelles il est difficile de distinguer clairement la MA parmi d'autres pathologies, sont sous-évalués.

5.4. Conclusion sur les données de prévalence et d'incidence

Les chiffres de prévalence et d'incidence qui apparaissent depuis une vingtaine d'années concernant la MA sont alarmants. La MA est d'ores et déjà un problème de santé publique majeur, mais la situation démographique vers laquelle nous nous dirigeons va encore accentuer le poids de ce fléau. Entre 2007 et 2050, la population mondiale devrait passer de 6,7 milliards à 9,2 milliards d'individus. Le nombre de personnes âgées va considérablement augmenter. En l'absence de mesures de prévention ou de traitement efficaces, le nombre de personnes atteintes de démences devrait quadrupler et avoisiner les 100 millions, soit plus d'une personne sur 100.

6. Problématique de santé publique

6.1. Aspects démographiques

Les dernières statistiques des Nations Unies font état de 6,9 milliards d'individus sur la planète en 2010 (Tableau 2). D'ici à 2050, la population mondiale va croître fortement, notamment en raison de l'émergence des pays en voie de développement. Les prévisions des Nations Unies sont de 9,1 milliards individus en 2050. Cette forte croissance démographique ira de pair avec un vieillissement généralisé de la population, l'âge médian passant de 29,1 en 2010 à 38,4 en 2050. Nous allons ainsi voir le nombre des personnes âgées de plus de 65 ans tripler et celui des personnes âgées de plus de 80 ans quadrupler (Tableau 2). Si la prévalence des démences reste identique, on verra donc le nombre de personnes atteintes de la MA augmenter dans des proportions équivalentes.

	Population (en milliers)	Age médian (en années)	Population âgée de plus de 65 ans (en milliers)	% des plus de 65 ans dans la population	Population âgée de plus de 80 ans (en milliers)	% des plus de 80 ans dans la population
2010	6 908 688	29,1	523 478	7,6	105 637	1,5
2015	7 302 186	30,2	601 185	8,2	123 431	1,7
2020	7 674 833	31,5	713 855	9,3	142 728	1,9
2025	8 011 533	32,8	832 326	10,4	160 765	2,0
2030	8 308 895	34,2	969 440	11,7	194 211	2,3
2035	8 570 570	35,5	1 115 886	13,0	242 344	2,8
2040	8 801 196	36,6	1 251 774	14,2	287 686	3,3
2045	8 996 344	37,5	1 363 865	15,2	339 901	3,8
2050	9 149 984	38,4	1 486 861	16,2	394 663	4,3

Tableau 2 : Données démographiques sur l'évolution du pourcentage des personnes âgées dans la population mondiale

En 40 ans le nombre de personnes âgées devrait fortement augmenter. La population âgée de plus de 65 ans devrait être multipliée par 3 et celle âgée de plus de 80 ans par un facteur 4. Source : base de données de l'ONU en 2008, http://data.un.org .

6.2. Aspects économiques

6.2.1. Coût de la MA dans le monde

L'importance de la MA en terme de prévalence est une source d'inquiétude importante sur la plan humain, mais également sur le plan économique. Les difficultés croissantes de financement de la prise en charge de la MA vont de pair avec la progression de la prévalence

de la maladie. A long terme, le financement de la prise en charge de la MA par nos sociétés risque de devenir un problème majeur.

En 2010, le coût mondial de la MA est estimé à 604 milliards de dollars américains. Si la MA était un état, il représenterait la 18ème puissance économique du monde devant l'Indonésie, la Belgique ou encore la Suède (Rapport de l'ADI 2010).

Les coûts de la MA peuvent être subdivisés selon 3 catégories : les coûts informels pris en charge par les proches, les coûts directs sociaux et les coûts directs médicaux tous deux pris en charge par les systèmes de santé des états. Les coûts informels et sociaux de la MA sont les principaux contributeurs (42% chacun) des coûts totaux. Les coûts directs médicaux ne prennent part que pour 16% d'entre eux (Tableau 3).

	Coûts informels	Coûts directs		Coûts totaux
		Coûts médicaux	Coûts sociaux	
Coûts (en millions de dollars)	251,89	96,41	255,69	603,99
Proportion des coûts totaux	41,7%	16,0%	42,3%	100%

Tableau 3 : Coûts de la MA dans le monde en 2010

D'après le World Alzheimer Report 2010 (Alzheimer's Disease International 2010).

6.2.2. Coût de la MA en France

En 2005 en France, l'Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé (OPEPS) estimait le coût annuel moyen par patient à 22 099 euros, dont 5 791 euros de dépenses médicales et 16 307 euros de dépenses médico-sociales. Les coûts de prise en charge directs auraient ainsi représenté près de 10 milliards d'euros pour la seule année 2005. L'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) avait estimé en 2000 le coût annuel par patient à 19 581 euros dont 43% de coûts liés à la prise en charge médicale, 27% à la prise en charge médico-sociale et 30% liés à la prise en charge par les familles des patients. En 2004, le même organisme estimait le coût de la MA en France à 9,9 milliards d'euros. Ces coûts ne relatent malheureusement pas toute l'étendue du problème. De nombreuses dépenses ne peuvent être réellement prises en compte : la perte de productivité liée à l'état du patient, la perte de productivité liée au temps de soins réalisés par la famille, la difficulté d'évaluation de certains coûts comme les admissions aux urgences ou les consultations hospitalières.

6.2.3. Evolution du coût

L'évolution du coût de la MA est difficile à évaluer, cependant d'après les estimations d'incidence et de prévalence et en l'absence de traitement ou de politique de prévention efficaces, on ne peut que prévoir une forte croissance du poids économique de la maladie.

Pour la France, l'OPEPS estime qu'en prenant en compte l'évolution du coût des services médico-sociaux et des salaires, le coût de la MA en 2040 serait environ trois à cinq fois plus élevé qu'en 2004, soit un coût allant de 9,9 milliards en 2004 à 28,9 ou 50,4 milliards d'euros en 2040 (Rapport INSERM 2007).

B. Neuropathologie

1. Observations macroscopiques

Les observations macroscopiques sont essentiellement relatives à l'atrophie du cerveau observée chez le patient atteint de la MA. Aux stades précoces de la maladie, l'atrophie est restreinte à certaines zones du cerveau: l'hippocampe, l'amygdale temporale et le pôle du lobe temporal. Dans les stades avancés de la maladie, l'atrophie se généralise à l'ensemble des régions du cerveau. Le poids des différents lobes cérébraux varie de façon hétérogène par rapport à celui de sujets sains de même âge: le lobe temporal est le plus affecté (diminution de 41% de la masse de tissu), suivi du lobe pariétal (diminution de 30%) et du lobe frontal (diminution de 14%) (Najlerahim 1988). Le poids du lobe occipital ne varie pas. La substance grise est plus affectée que la substance blanche par l'atrophie. Le cortex peut être vu comme un ruban replié sur lui-même pour former les circonvolutions. La taille du ruban cortical est affectée aussi bien en longueur (Duyckaerts 1985) qu'en épaisseur (Querbes 2009).

2. Observations microscopiques

Deux types de lésions anatomo-pathologiques caractéristiques peuvent être mis en évidence dans le tissu cérébral des patients atteints de la MA. D'une part, les agrégats de peptides amyloïdes forment les plaques amyloïdes dans l'espace extracellulaire. D'autre part, les agrégats de protéines Tau forment les dégénérescences neurofibrillaires dans l'espace intracellulaire. Il est aujourd'hui impossible de dire avec certitude si l'une des deux lésions engendre l'autre. Dans cette incertitude généralisée, la communauté scientifique se divise entre partisans de l'hypothèse "baptiste" (en rapport avec les lésions β-amyloïdes) et partisans de l'hypothèse "tauiste" (en rapport avec les lésions de la protéine Tau). La première

hypothèse appelée hypothèse de la cascade amyloïde tend à montrer que le peptide amyloïde, composant majeur des plaques amyloïdes, est l'initiateur d'une cascade d'événements physiopathologiques conduisant à la MA. A l'inverse, l'hypothèse tauiste décrit les formes pathologiques de la protéine Tau, composantes principales des dégénérescences neurofibrillaires, comme étant à la base du déclin cognitif ayant lieu pendant le développement de la pathologie. Une troisième voie est également à prendre en considération mettant en cause l'implication coordonnée des deux types de lésions. La réalité est en effet probablement moins tranchée que ce que pourrait laisser penser les deux premières hypothèses.

2.1. La cascade amyloïde

2.1.1. Maturation de l'APP

Le composant majeur des plaques séniles est un petit peptide de 39 à 43 acides aminés, connu sous le nom d'Amyloïde-β ou Aβ. Bien que la présence de plaques séniles dans le cerveau de patients atteints de la MA soit connue depuis le début du XXème siècle, la description du peptide Aβ a été réalisée pour la première fois en 1984 (Glenner 1984).

2.1.1.1. L'APP

La protéine précurseur de l’amyloïde (Amyloid Precursor Protein ou APP) est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés (87 kDa) qui présente une forte homologie avec certains récepteurs cellulaires (Kang 1987). L'APP est produite dans de nombreux types cellulaires, son expression étant régulée en fonction du stade de développement. L'APP est surtout exprimée dans la membrane cytoplasmique mais aussi dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et au niveau des membranes endosomales, lysosomales et mitochondriales (Laferla 2007). La forme d'APP la plus représentée dans le cerveau humain est la forme de 695 acides aminés (APP695). La partie extracellulaire située du coté N-terminale représente 88% de l'APP695 (Figure 6). Le domaine intracellulaire de l'APP (AICD pour APP IntraCellular Domain) ne représente qu'une petite partie de la molécule. Le peptide Aβ est le produit du clivage de l'APP. Le segment relatif à la formation du peptide Aβ est composé d'une partie de l'extrémité N-terminale extracellulaire et d'un segment transmembranaire (Reinhard 2005).

En fonction des sécrétases impliquées, le clivage de l'APP induit la production de différents peptides (Figure 6).

L'action combinée de la β sécrétase (BACE1 pour βAPP Cleaving Enzyme) et de la γ-sécrétase induit la production de peptide β-amyloïde. Cette voie de maturation de l'Aβ est dite « voie amyloïdogénique ».

Une autre voie de maturation peut avoir lieu, il s'agit de la voie dite "voie non amyloïdogénique". Dans ce cas, l'APP est clivée par l'α-sécrétase. Cette coupure intervient dans la séquence de l'Aβ prévenant ainsi la production de peptide Aβ.

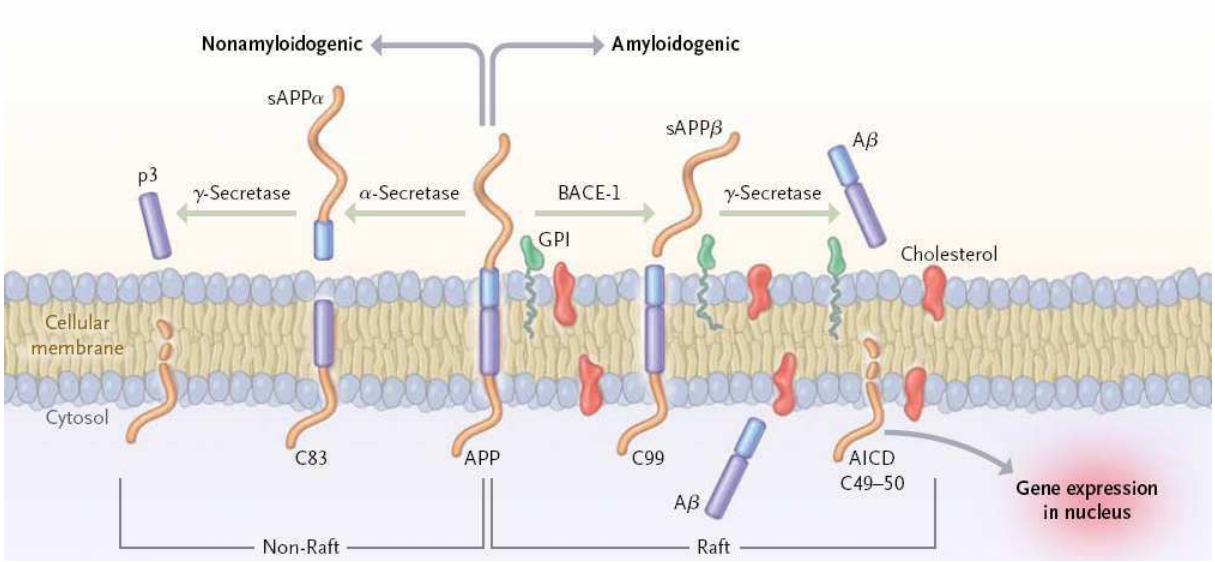


Figure 6: Voie de maturation de l'APP

D'après Querfurth 2010.

2.1.1.2. La voie amyloïdogénique

La voie amyloïdogénique est le processus de maturation qui conduit à la formation de peptide Aβ. La voie amyloïdogénique fait intervenir deux types de sécrétases : la β sécrétase (ou BACE 1) et la γ-sécrétase. La β-sécrétase clive l'APP du coté N-terminale libérant ainsi une grande partie de la molécule initiale dans l'espace extracellulaire (sAPPβ). Le peptide de 99 acides aminés restant (C99) est par la suite clivé par la γ-sécrétase libérant alors des peptides Aβ de différentes tailles dans l'espace extracellulaire et le domaine intracellulaire de l'APP (APP IntraCellular Domain ou AICD).

La β-sécrétase, aussi appelée BACE 1 (βAPP Cleaving Enzyme) ou memapsin, est responsable de la quasi-totalité de la production d'Aβ. Il existe un homologue de BACE 1 appelé BACE 2, mais il n'est que faiblement représenté dans le cerveau. L'inactivation de BACE 1 inhibe presque totalement la production d'Aβ.

La γ-sécrétase est un complexe multiprotéique qui porte l'activité enzymatique permettant le clivage de l'APP. Ce complexe est formé par 4 protéines : les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), la nicastrine (NCT), Aph-1 (Anterior Pharynx Defective 1 homolog) et Pen-2 (Presenilin Enhancer 2 homolog) (Figure 7). L'inactivation d'une seule de ces quatre protéines provoque une diminution drastique de la production de peptide Aβ (Edbauer 2003).

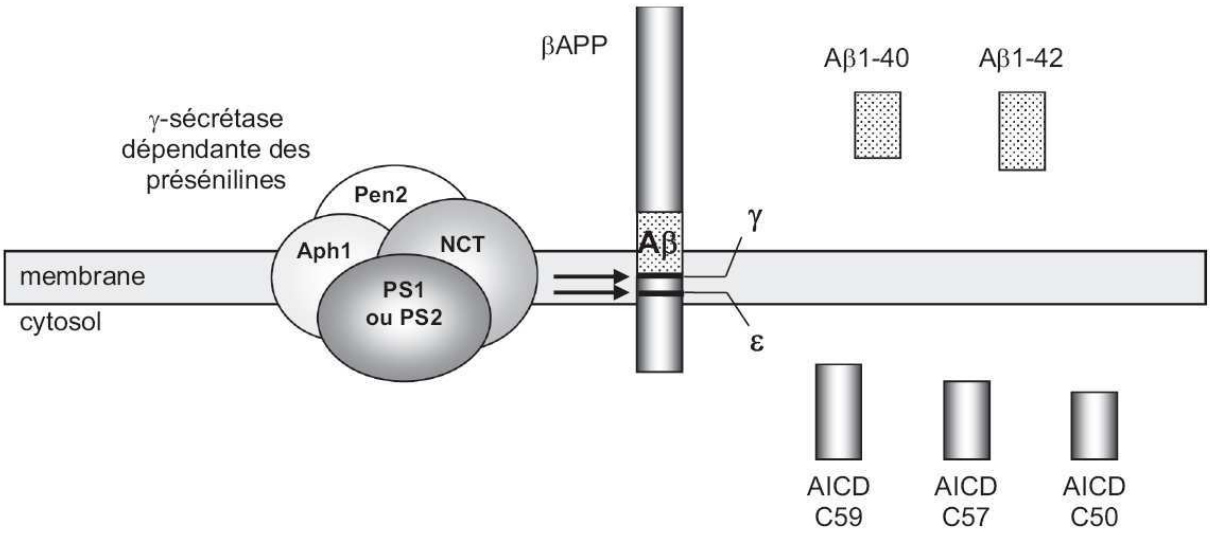


Figure 7: Clivage de l'APP par le complexe γ-sécrétase

Le complexe γ-sécrétase est formé de quatre protéines qui effectuent le clivage de l'APP pour former le peptide Aβ. Aph1: Anterior Pharynx Defective 1 homolog; pen-2: preseniline enhancer 2, NCT: Nicastrine; PS: preseniline; AICD: APP IntraCellular Domain. D'après le rapport « Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux », INSERM, 2007.

La γ-sécrétase peut réaliser 2 types de coupures distinctes conduisant à la formation de peptides de 40 (Aβ40) ou 42 (Aβ42) acides aminés. Cette coupure intervient au niveau de l'insertion de l'APP dans la membrane cellulaire (Figure 7). Lors du développement de la MA la forme Aβ42 se retrouve majoritaire par rapport à la forme Aβ40 (Selkoe 2001). La forme de 42 acides aminés s'agrège plus facilement (Burdick 1997).

La γ-sécrétase conditionne également la longueur des AICD: ils peuvent être composés de 57 (AICDC57) ou de 59 (AICDC59) acides aminés. Ces peptides joueraient le rôle de facteur de transcription intracellulaire (Leissring 2002).

2.1.1.3. La voie non amyloïdogénique

La voie non amyloïdogénique est la voie majoritaire de maturation de l'APP. Elle représente le processus de maturation qui conduit à la sécrétion de la partie N-terminale de l'APP après clivage par la α-sécrétase. Cette voie induit la production de peptides qui semblent avoir des effets bénéfiques sur le tissu cérébral. D'une part, la coupure de l'APP intervient au milieu de la séquence du peptide Aβ, ce qui inhibe sa formation. D'autre part, le fragment correspondant à la partie N-terminale de l'APP aussi appelé sAPPα semble avoir des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices (Mattson 1997).

La α-sécrétase impliquée dans cette voie de maturation est une enzyme de la famille des métalloprotéases dont l'activité est régulée selon deux voies distinctes : la voie constitutive sous contrôle de la protéine kinase A et une seconde voie régulée par la protéine kinase C (Checler 1995, pour revue). La coupure par la α-sécrétase libère un peptide nommé sAPPα dans l'espace extracellulaire. Ce peptide semble réguler l'excitabilité neuronale et augmenter la plasticité synaptique, favorisant ainsi les processus d'apprentissage et de mémoire. La partie C-terminale de 83 acides aminés aussi appelée C83 reste fixée à la membrane. C83 est ensuite dégradée via la voie lysosomale ou est clivée par la γ-sécrétase ce qui induit la formation d'un domaine intracellulaire de l'APP (AICD pour APP IntraCellular Domain) et d'un peptide d'environ 3 kDa nommé p3 qui est libéré dans l'espace extracellulaire (Haass 1993).

2.1.2. La cascade amyloïde

2.1.2.1. Description générale de l'hypothèse

Au début des années 90, il a été proposé que les lésions β-amyloïdes étaient au cœur de la physiopathologie de la MA (Hardy 1992 et Selkoe 1991). Cette proposition communément appelée hypothèse amyloïde ou cascade amyloïde, établit l'Aβ non plus comme la conséquence mais comme la cause de la pathologie. Cette hypothèse est basée sur plusieurs observations. Les personnes atteintes du syndrome de Down sont porteuses d'un allèle supplémentaire de l'APP et développent des formes familiales de la MA. Les mutations portant sur les gènes liés au métabolisme de l'APP et donc de l'Aβ induisent le développement de formes familiales de la MA. L'Aβ est toxique pour les neurones en culture et cette toxicité peut être inhibée par un traitement anti-Aβ (Finder 2007). L'Aβ pourrait induire l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, composante majeure des lésions neurofibrillaires (De Felice 2008). Les mutations du gène codant la protéine Tau induisent le développement de démences frontotemporales parkinsoniennes et non le développement de la MA

(Spillantini 1998). Toutes ces observations ont amené à penser que le peptide Aβ était l'initiateur du processus neurodégénératif conduisant à la MA (Figure 8). Les modes d'action de l'Aβ dans la physiopathologie de la MA sont nombreux: agrégation, toxicité synaptique, toxicité mitochondriale, induction de la pathologie neurofibrillaire (Querfurth 2010, pour revue).

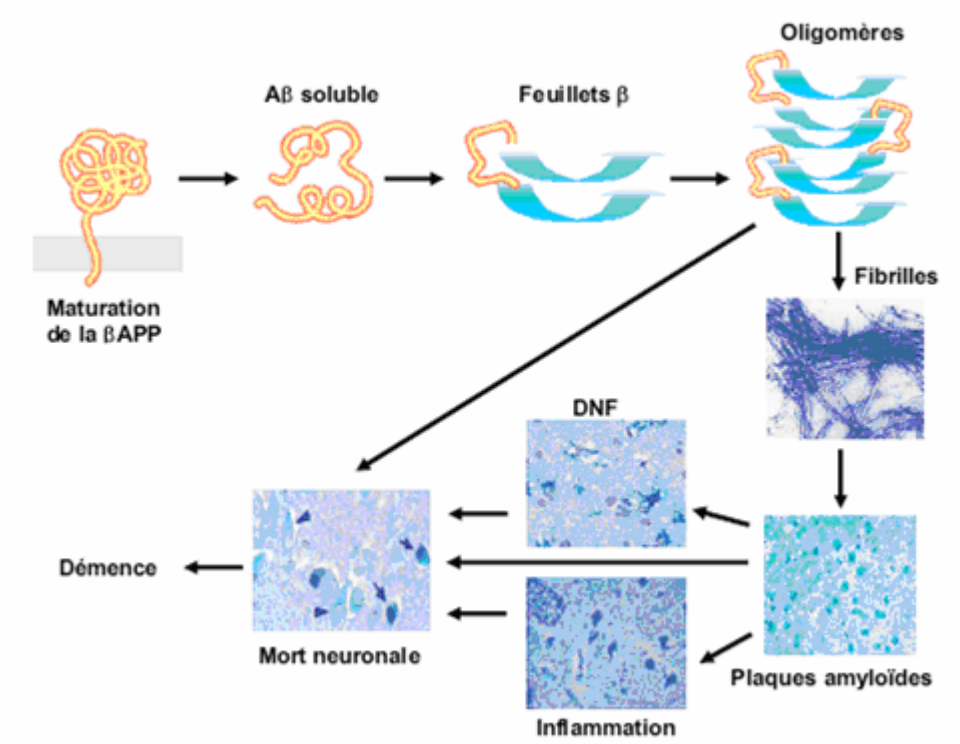


Figure 8: Hypothèse de la cascade amyloïde

DNF: Dégénérescences neurofibrillaires. D'après Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifique, médicaux et sociétaux, INSERM, 2007.

2.1.2.2. L'agrégation

L'agrégation du peptide β-amyloïde est au centre de toute l'hypothèse amyloïde. Initialement, l'Aβ est libéré dans l'espace extracellulaire sous forme de monomères de 4 kDa. Sous l'effet de facteurs encore mal compris, ces monomères, solubles, interagissent entre eux donnant ainsi naissance à un large éventail d'oligomères. L'agrégation et l'agrandissement des formes oligomériques de l'Aβ mènent à la formation de fibrilles insolubles et à terme à la formation de plaques amyloïdes de grandes dimensions (Figure 8). Ce processus n'est pas spécifique à l'Aβ. Il s'agit d'un processus de nucléation et de polymérisation emprunté par de nombreuses molécules "agrégantes" (Finder 2007).

L'agrégation des peptides Aβ est sous le contrôle de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à la charge, à l'hydrophobicité et aux propriétés structurelles

secondaires de la molécule. Le peptide Aβ présente notamment une forte propension à former des feuillets β-croisés plutôt que des hélices α ce qui le rend plus prompt à former des agrégats amyloïdes (Williams 2004). Les facteurs extrinsèques regroupent les variables de température, pH, stress oxydatif ou encore de concentration de peptides Aβ qui vont moduler l'intensité de formation des agrégats. La balance entre production et dégradation de l'Aβ joue un rôle primordial dans la concentration du peptide. Dans les formes familiales de la maladie, les processus de production sont fortement altérés notamment à cause des mutations au niveau de l'APP et des sécrétases. Cependant, aucune évidence ne permet de démontrer une altération des processus de formation de l'amyloïde dans les formes sporadiques de la maladie. A l'heure actuelle, ce sont les processus de dégradation qui sont essentiellement mis en cause dans l'augmentation de la quantité de peptide amyloïde. L'implication de plusieurs protéases dans ces processus de dégradation a pu être mise en évidence : la néprilysine (NEP), l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE). La surexpression ou l'inactivation de ces enzymes induit une modification notable des taux de peptide Aβ soluble, du nombre de plaques séniles ou encore des performances cognitives chez l'animal.

Si le processus d'agrégation est considéré comme étant le point le plus important de la cascade amyloïde, il faut noter que le peptide Aβ peut se retrouver sous de nombreuses formes agrégées dans le cerveau. Pendant longtemps, les formes insolubles de l'Aβ ont été considérées comme étant les formes les plus toxiques à cause de leur forte représentativité dans les plaques séniles. Cependant, leur implication dans les processus neurodégénératifs est fortement remise en cause. D'une part, la quantité et la topographie des agrégats d'Aβ ne sont pas corrélées aux stades de développement de la MA (Braak 1991). D'autre part, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la quantité de formes solubles d'Aβ est mieux corrélée avec la sévérité de la maladie que la quantité de formes insolubles (Lue 1999, McLean 1999). La neurodégénérescence liée à la maturation de l'Aβ serait donc le résultat de l'activité de ces formes solubles. De plus, toutes les formes solubles d'Aβ ne présentent pas le même profil toxicologique. En 2002, Dahlgren *et al.* ont montré que les monomères étaient 40 fois moins toxiques que les oligomères. La découverte de l'importance des formes oligomériques d'Aβ dans la physiopathologie de la MA relèguent aujourd'hui les plaques amyloïdes à un rôle de réservoirs de formes solubles d'Aβ représentant le stade final du processus (Haass 2007).

2.1.2.3. Toxicité synaptique

Lors de la MA, le nombre de synapses est fortement réduit et cette diminution est mieux corrélée avec les déficits cognitifs que la quantité de plaques amyloïdes (Terry 1991). Le nombre de synapses est très diminué dans les zones de fortes densités en Aβ oligomériques (Koffie 2009). Les molécules de signalisation situées au niveau des synapses et qui permettent la mise en place des processus de mémoire sont altérées. La quantité de synaptophysine, une protéine transmembranaire située dans la membrane des vésicules présynaptiques, est diminuée de 25% chez les patients atteints de la MA. L'Aβ induit également une diminution de la libération des neurotransmetteurs présynaptiques et une modification des courants ioniques post-synaptiques, liée à une endocytose des récepteurs du glutamate.

2.1.2.4. Atteintes membranaires

L'un des mécanismes de toxicité neuronale de l'Aβ pourrait être l'induction de dommages de la membrane cellulaire (Finder 2007). L'Aβ pourrait provoquer la formation de canaux ou de pores à travers la membrane plasmique. Cette augmentation de la perméabilité favoriserait l'entrée d'ion Ca^{2+}, dérégulerait l'homéostasie du calcium et au final induirait l'apoptose des neurones. Ces pores ont pu être mis en évidence dans le tissu cérébral de patients atteints de la MA par microscopie à transmission électronique à haute résolution (Inoue 2008). De plus, une dérégulation de l'homéostasie calcique a pu être mise en évidence chez des patients atteints de la MA.

2.1.2.5. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un élément majeur de l'hypothèse amyloïde (Sultana 2009). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et les espèces réactives de l'oxyde d'azote (RNS pour Reactive Nitrogen Species) sont les acteurs du stress oxydant. Les ROS et les RNS peuvent provoquer des dommages oxydatifs sur de nombreuses molécules comme l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines. Elles peuvent être produites via différents mécanismes (Crouch 2008)

L'une des principales sources de ROS est la mitochondrie. Chez les patients atteints de la MA, la morphologie, l'activité et le nombre de mitochondries sont diminués. L'Aβ s'accumule à l'intérieur des mitochondries et altère le métabolisme énergétique en inhibant l'activité de plusieurs enzymes mitochondriales. La chaîne de transport des électrons, la production d'ATP, la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane mitochondrial sont altérés. Les quantités de radical superoxide et de peroxyde d'hydrogène augmentent alors

considérablement. Le peroxyde d'hydrogène est capable de causer des dommages à l'intérieur même de la mitochondrie mais également de diffuser dans le cytosol et d'affecter d'autres cibles intracellulaires.
La microglie activée est également une source importante de production de RNS.
Les dommages causés par les ROS et RNS peuvent être de différents types. L'oxydation des lipides membranaires produit des aldéhydes toxiques. L'oxydation de certaines protéines conduit à la formation de dérivés carbonés ou nitrés. L'altération des membranes pourrait conduire à une modification de l'homéostasie du glucose ou d'ions comme le calcium.
De nombreuses traces de stress oxydatif sont associées à la MA. Des dommages oxydatifs de l'ADN ont été mis en évidence chez l'homme et dans des modèles murins de la MA. Les marqueurs du stress oxydatif précèdent les lésions pathologiques dans certains modèles animaux de la MA. Certaines études ont montré l'impact de la consommation d'antioxydants sur les performances cognitives (Vingtdeux 2008).

2.1.2.6. Inflammation

On trouve une forte quantité de cellules microgliales et astrocytaires activées dans le cerveau des patients atteints de la MA, particulièrement à proximité des amas fibrillaires d'Aβ (Wyss-Coray 2002).
Conçus à la base comme mécanisme de défense immunitaire du système nerveux, ces deux types cellulaires finissent par participer au développement de la pathologie. Par exemple, la microglie activée réalise un travail de protection en internalisant l'Aβ et en la dégradant. Cependant la quantité d'Aβ étant trop importante dans la MA, la microglie est activée de manière chronique. Elle produit alors un ensemble de chémokines et de cytokines qui vont endommager les tissus environnants. Les chémokines induisent la migration de monocytes du sang périphérique vers les espaces cérébraux à forte densité en plaques amyloïdes. Les cytokines comme l'interleukine 1, l'interleukine 6 et le facteur tumoral de nécrose α (TNF-α) vont induire des lésions sur les cellules endommagées comme sur les cellules saines accélérant ainsi le processus létal. Les astrocytes activés libèrent également une série de molécules destinées à combattre l'invasion de l'Aβ mais qui sont aussi peu spécifiques envers leurs cibles (protéine C-réactive, alpha1-antichemotrypsine…). Enfin, la microglie activée comme l'Aβ fibrillaire est capable de stimuler la voie du complément favorisant ainsi l'autolyse des cellules environnantes (McGeer 2001).

2.1.2.7. Action sur la protéine Tau

L'hypothèse amyloïde propose une action du peptide Aβ sur les modifications de la protéine Tau qui mènerait à la formation des DNF et à la pathologie du cytosquelette (Figure 9). Ce mode d'action passerait notamment par le stress oxydant causé par le peptide Aβ. Le stress oxydant favoriserait l'hyperphosphorylation de Tau et donc favoriserait le processus d'agrégation de la protéine.

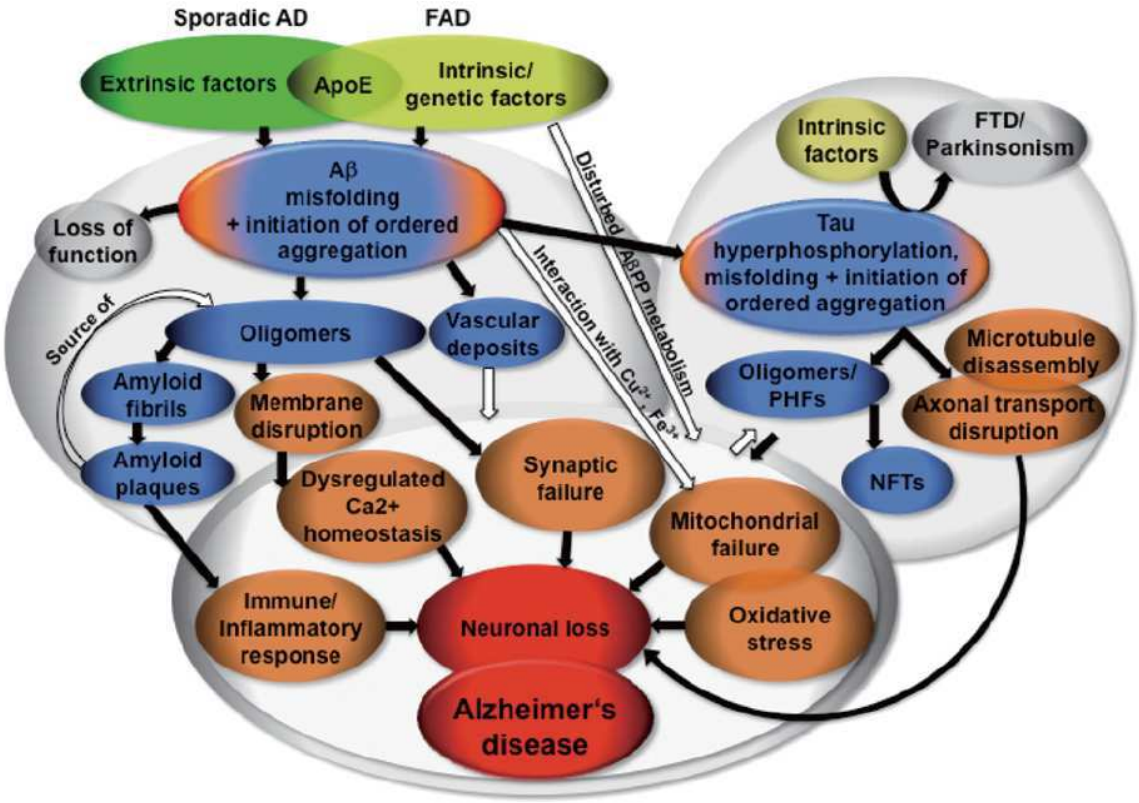


Figure 9: Schéma des mécanismes impliqués dans la cascade amyloïde

FTD: Démences fronto-temporales, FAD: Forme familiale de la maladie d'Alzheimer, NFTs: Dégénérescences neurofibrillaires, PHFs: paires de filaments hélicoïdaux. D'après Finder 2007.

2.1.3. Topographie des lésions Aβ

L'évolution topographique des lésions à travers le tissu cérébral se décompose en trois grands stades (Figure 10 - Braak 1991).

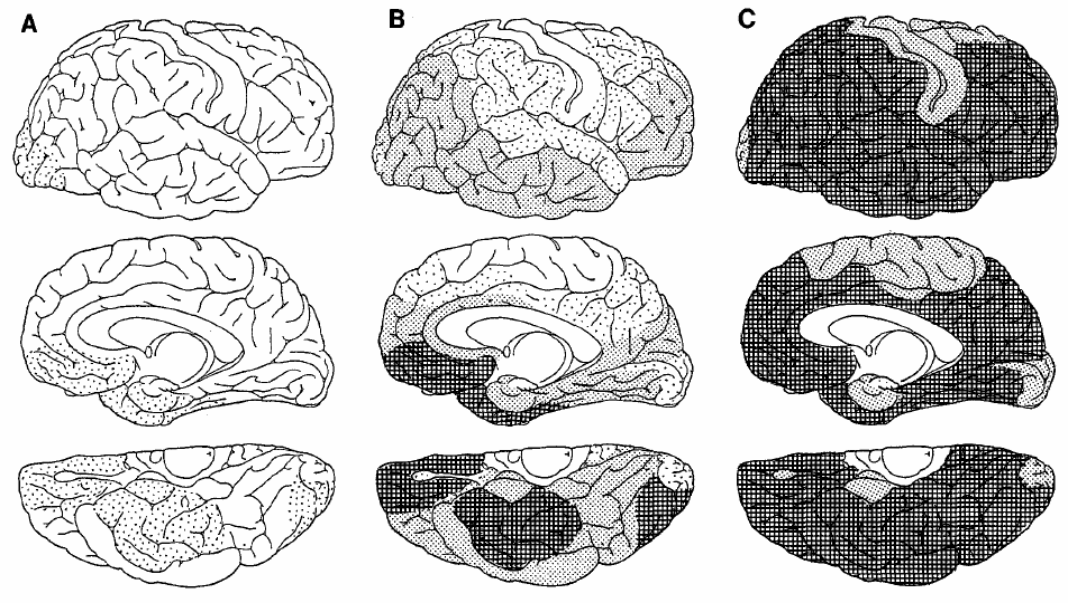


Figure 10: Evolution de la distribution des dépôts amyloïdes chez l'Homme

L'évolution de la distribution des dépôts amyloïdes se distingue en trois étapes selon la sévérité de la pathologie (de A à C). L'augmentation du niveau de gris correspond à une augmentation du nombre de dépôts amyloïdes. Le cerveau est vu selon trois plans: vue latérale externe en haut, vue dans le plan sagittal médian au milieu, vue de dessous d'un hémisphère en bas. A: Les premières lésions amyloïdes se trouvent dans les parties basales de l'isocortex. B : Toutes les aires associatives isocorticales présentent des lésions amyloïdes. L'hippocampe est faiblement affecté. C : Toutes les aires isocorticales ainsi que l'hippocampe sont affectés. D'après Braak 1991.

Les parties basales des cortex frontaux, temporaux et occipitaux sont dans un premier temps affectées par des dépôts diffus et peu nombreux de peptide amyloïde. La région hippocampique est alors épargnée. Les PA envahissent dans un second temps toutes les aires isocorticales à l'exception des aires sensorimotrices primaires. La densité des dépôts augmente. L'hippocampe est modérément affecté. Dans un troisième temps, le nombre de plaques amyloïdes augmente considérablement dans tout le cortex, le striatum, le thalamus, l'hypothalamus et les noyaux profonds. Même à ce dernier stade, l'hippocampe présente une densité de dépôts modérés. L'évolution de ce stade concerne essentiellement les aires isocorticales primaires dans lesquelles la quantité de plaques croît fortement. La progression topographique des lésions amyloïdes se fait en sens inverse de celle des lésions liées à la protéine Tau. La progression des lésions amyloïdes n'est pas corrélée aux symptômes de la MA: l'hippocampe est par exemple atteint tardivement et relativement modérément alors que les troubles mnésiques sont précoces.

2.2. Les dégénérescences neurofibrillaires

2.2.1. La protéine Tau

La protéine Tau (Tubulin Associated Protein) appartient à la famille des "Microtubules Associated Proteins" (MAP). Les microtubules (MT) sont des éléments majeurs du cytosquelette neuronal. Ils assurent le maintien de la morphologie des neurones et servent de réseau pour le transport axonal. La protéine Tau possède un rôle majeur dans la polymérisation, la stabilisation et la dynamique des microtubules (Cleveland 1977).

La protéine Tau est principalement exprimée dans les axones (Binder 1985). Elle est codée par un gène situé en position 17q21 du chromosome 17. Ce gène est composé de 16 exons, mais dans le cerveau humain seuls 11 exons servent à la production de la protéine Tau (Neve 1986, Goedert 1988). Dans le cerveau, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 permet d'obtenir six isoformes distinctes (Figure 11). Elles sont composées de 352 à 441 acides aminés et leur poids moléculaire varie de 45 à 65 kDa.

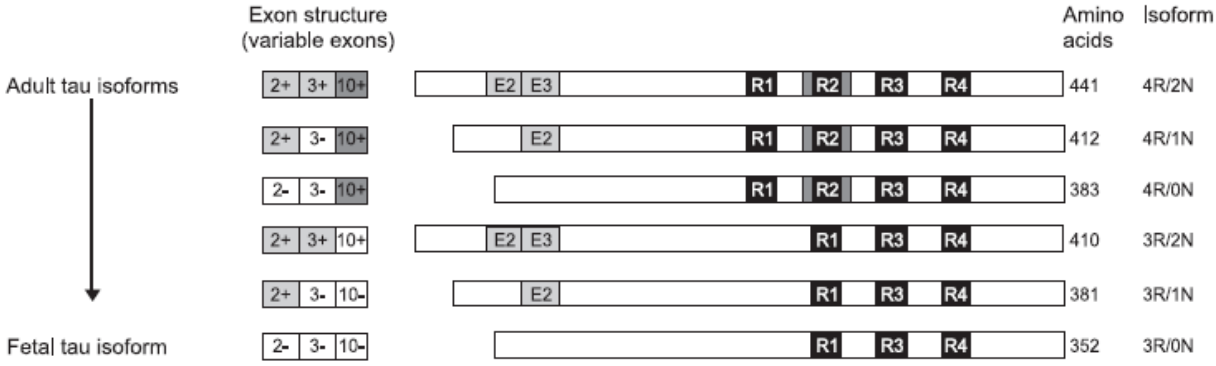


Figure 11: Description des 6 isoformes de la protéine Tau

Il existe 6 isoformes de la protéine Tau, qui en fonction de la présence ou l'absence des exons 2, 3 et 10 peuvent comporter de 352 à 441 acides aminés. D'après Brandt 2005.

La partie C-terminale de la protéine comporte 3 ou 4 séquences répétées notées de R1 à R4. L'épissage alternatif de l'exon 10 produit des isoformes de Tau avec 3 (exon 10-) ou 4 (exon10+) domaines répétés (Figure 11). Les isoformes composées de trois domaines répétés ne disposent pas de R2 et sont regroupées sous le terme de « Tau 3R ». Les isoformes composées de 4 domaines répétés sont regroupées sous le terme de « Tau 4R ».

L'épissage alternatif des exons 2 et 3 permet l'insertion de 0 (0N; exons 2-,3-), 1 (1N; exons 2+, 3- ou inversement) ou 2 (2N; exons 2+,3+) séquences de 29 acides aminés chacune (Figure 11).

Dans le cerveau adulte humain, on trouve autant d'isoformes 3R que 4R et le ratio entre les isoformes 0N, 1N et 2N est respectivement de 37, 54 et 9% (Brandt 2005). Ces différentes isoformes sont exprimées à différents stades du développement humain. Ainsi, seule l'isoforme 3R/0N est présente dans le cerveau du fœtus alors que les autres isoformes apparaissent durant la période post natale.

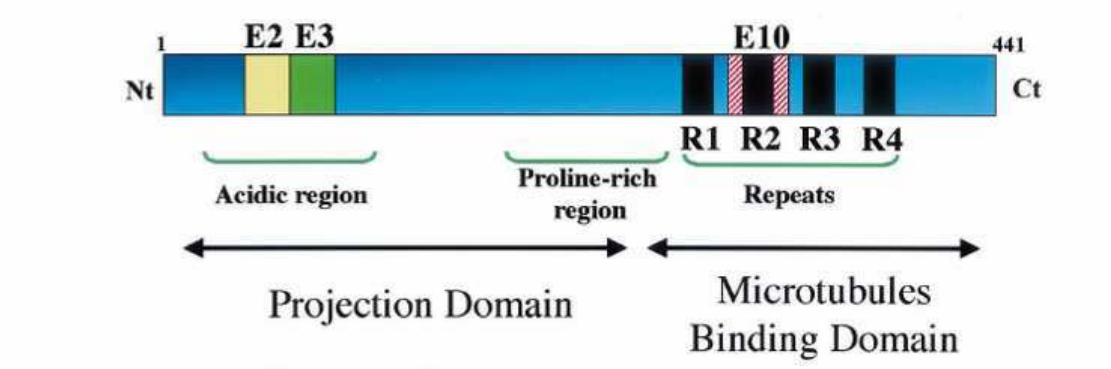


Figure 12: Représentation Schématique de la protéine Tau

Représentation de l'isoforme la plus longue de la protéine Tau (2+,3+,10+). Nt: côté N-terminal, Ct: côté C-terminal. D'après Buée 2000.

La protéine Tau possède deux domaines distincts: le domaine de projection situé dans la partie N-terminale et le domaine de liaison aux microtubules situé dans la partie C-terminale (Figure 12).

Le domaine de projection est composé d'une part d'une région acide chargée négativement qui comprend les 2 inserts issus des exons 2 et 3, et d'autre part d'une région riche en proline, basique et chargée positivement. La région riche en proline est le siège de nombreuses modifications post traductionnelles avec notamment de nombreux sites de phosphorylation. Cette région joue un rôle important dans la liaison de la protéine Tau avec les microtubules.

Le terme "domaine de projection" s'explique par le fait que cette partie de la protéine Tau pourrait se projeter à partir des microtubules pour aller interagir avec des organites intracellulaires comme les mitochondries, d'autres éléments du cytosquelette comme l'actine, ou encore avec des éléments de la membrane plasmique (Lee 1998).

Le domaine de liaison aux microtubules est composé d'une région acide située à l'extrémité C-terminale et d'une région dans laquelle se fait réellement la liaison avec les microtubules.

La région de liaison aux microtubules est composée de 3 à 4 domaines répétés (R1 à R4). Ces domaines contrôlent la fixation de la protéine avec les microtubules et donc leur stabilité. Ils sont similaires mais pas complètement identiques. Ils sont composés de 31 ou 32 acides

aminés chacun: une séquence répétée de 18 acides aminés hautement conservés et une séquence "inter-repeats" de 13 ou 14 acides aminés moins conservés.

L'interaction avec les MT se fait par des liaisons électrostatiques. La tubuline est chargée négativement dans son extrémité C-terminale et le domaine de liaison aux MT est chargé positivement (Buée 2000).

Les formes Tau 4R fournissent une interaction plus forte avec les dimères de tubuline et donc favorisent la stabilité des microtubules de manière plus importante. Cependant, la partie la plus importante dans l'interaction avec les MT semble être le peptide KVQIINKK qui se situe dans la séquence entre R1 et R2 (Buée 2000). La séquence inter-région R1-R2 ne se trouve que dans les formes Tau 4R. Sa présence induit une affinité de liaison avec les microtubules 40 fois plus élevée de la forme Tau 4R par rapport à la forme Tau 3R (Panda 1995).

2.2.2. Agrégation de la protéine Tau dans la MA

Le processus d'agrégation des protéines Tau menant à la formation des DNF n'est pas encore clairement établi. D'après les données de la littérature, certaines séquences d'événements ont pu être mise à jour (Binder 2005). Dans un premier temps, la protéine Tau doit être dissociée des MT pour se retrouver libre dans le cytoplasme des neurones (Figure 13). Cette dissociation pourrait être médiée par la phosphorylation anormale et l'hyperphosphorylation de Tau. D'autres modifications post-traductionnelles pourraient alors avoir lieu. Le changement conformationnel de Tau induit par une protéolyse partielle pourrait conduire à la formation de feuillets β croisés. La structure de la molécule ainsi modifiée permettrait alors de former des dimères de protéines Tau en position tête-bêche. Ces dimères pourraient initier un processus de nucléation menant à la formation d'oligomères puis de protomères (filaments de protéine Tau). L'association de deux protomères enroulés l'un autour de l'autre formerait alors les paires de filaments hélicoïdaux (PHF pour Paired Helical Filaments). L'augmentation de concentration de protéines Tau libres dans le cytoplasme neuronal augmentant, ce processus d'agrégation n'aurait de cesse de s'amplifier faisant ainsi augmenter le nombre de PHF jusqu'à former les dégénérescences neurofibrillaires ou DNF.

Les DNF se trouvent presque exclusivement à l'intérieur des neurones, dans les axones des neurones, lieu où la concentration en protéines Tau est la plus importante. Avec l'évolution de la maladie, on trouve progressivement une quantité de DNF plus importante dans le corps cellulaire des neurones.

L'origine de la toxicité des agrégats de protéines Tau reste encore mal comprise. Il semble cependant évident que la perte de fonction causée par la dissociation de Tau avec les MT

induit leur déstabilisation. La génération de nouvelles protéines Tau destinée à combler ce déficit serait également à l'origine d'autres dysfonctions. La forme la plus longue de Tau serait trop représentée et altérerait le transport axonal et la stabilité des MT (Dubey 2008).

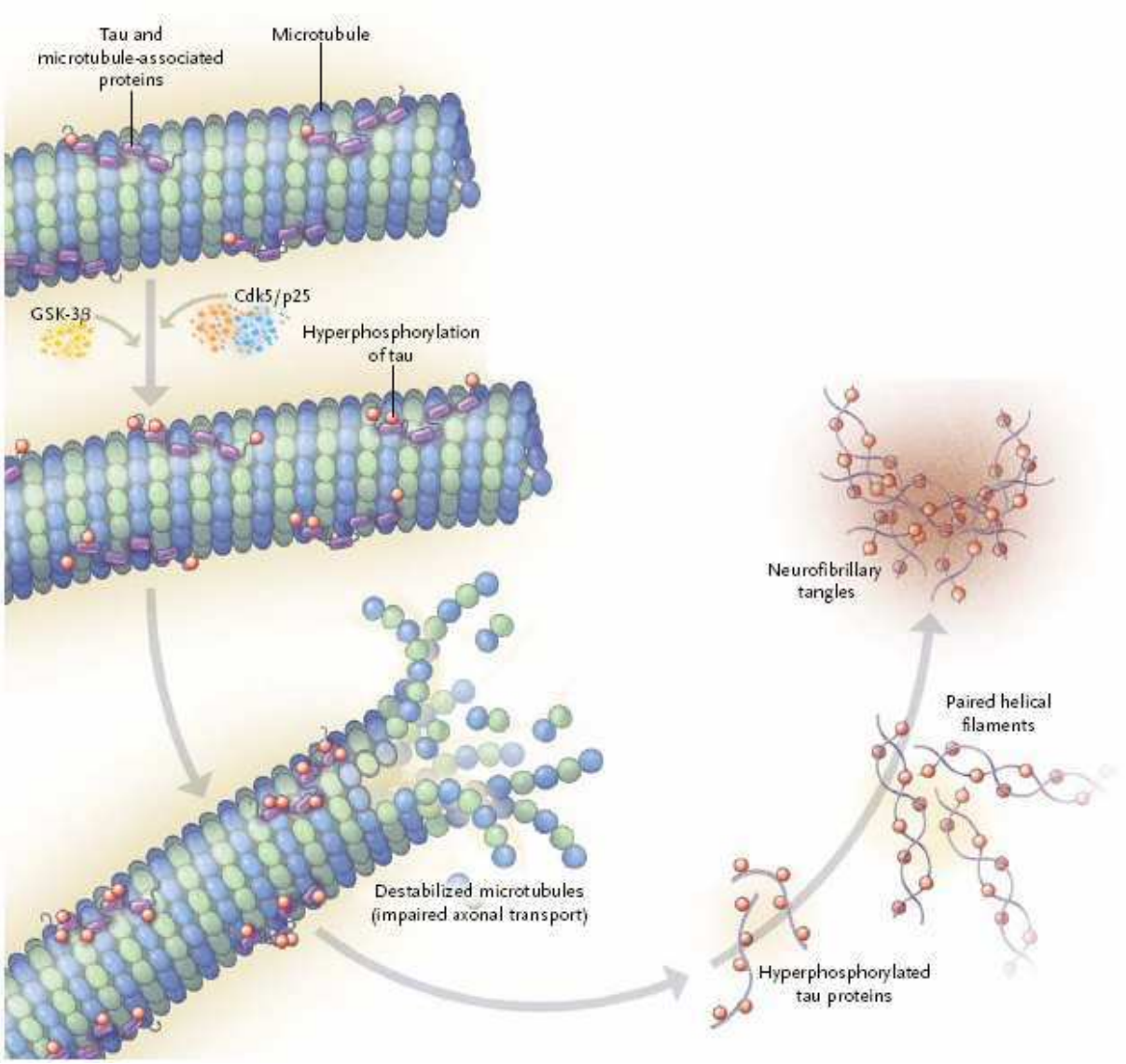


Figure 13: Agrégation de la protéine Tau et dysfonction des microtubules

La phosphorylation pathologique de la protéine Tau induit une dissociation de la protéine avec les microtubules. Les microtubules sont déstabilisés et se dissocient. Les protéines Tau libres s'agrègent dans l'espace intracellulaire, forment les paires de filaments hélicoïdaux puis les dégénérescences neurofibrillaires. D'après Querfurth 2010.

2.2.3. La dysfonction de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer

La protéine Tau est le composant principal des paires de filaments en hélice (Paired Helical Filament ou PHF) retrouvés dans la MA (Brion 1985). Cependant la présence d'agrégats de protéine Tau n'est pas spécifique de la MA. C'est la topographie des lésions et la présence conjointe d'agrégats de peptide amyloïde qui permet de caractériser la MA.

On trouve des agrégats de protéine Tau dans de nombreuses pathologies telles que les syndromes parkinsoniens, la maladie de Pick, les démences frontotemporales liées au chromosome 17 (DFTP-17). Toutes ces pathologies sont regroupées sous le nom de tauopathies.

2.2.4. Modifications post-transcriptionnelles de la protéine Tau

On retrouve chez les patients atteints de tauopathies plusieurs modifications post-transcriptionnelles de la protéine Tau. Hyperphosphorylation, protéolyse, ubiquitination, glycosylation ou encore glycation sont des processus qui pourraient intervenir dans l'agrégation de la protéine Tau (Wang 2008, pour revue).

2.2.4.1. Phosphorylation

La phosphorylation est un processus impliqué dans la régulation de l'activité de la protéine Tau en conditions physiologiques (Sergeant 2008).

A l'état déphosphorylé, la protéine Tau est fixée sur les microtubules, jouant ainsi son rôle de stabilisateur (Figure 14). Cependant, cette fixation ne peut être permanente car elle est un obstacle pour bon nombre de processus physiologiques tels que le transport axonal le long des microtubules ou encore la plasticité du cytosquelette. Il existe donc une balance entre l'état phosphorylé et l'état déphosphorylé.

Une fois phosphorylée, la protéine Tau se libère des microtubules. Les processus physiologiques précités peuvent avoir lieu, avant une nouvelle déphosphorylation qui permettra la fixation de Tau sur les microtubules. Cette balance permet de garder un équilibre entre stabilisation des microtubules et bon fonctionnement du neurone (Figure 14).

La balance entre phosphorylation et déphosphorylation est régulée par diverses kinases et phosphatases. Plus de 20 kinases différentes sont capables de phosphoryler la protéine Tau. Ces kinases se regroupent en 4 familles :

- les « proline-directed protein kinases » (PDPK) : elles phosphorylent les résidus Serine et Thréonine lorsqu'ils sont suivis d'une Proline. Ce groupe comprend notamment CDK1, CDK5, les MAPK et SAPK.

- Le groupe des non-PDKP comprend la Tau-tubulin kinase 1 et 2, la casein kinase 1, 2 et 1sigma, DYRK, MARK, PKA, PKB/AKT, PKC et PKN.
- Le troisième groupe inclut les kinases qui phosphorylent les résidus Serine et Thréonine, parfois seuls, parfois suivis d'une Proline.
- Le quatrième groupe comprend les Tyrosines kinases telles que Src ou C-abl.

Contrairement aux kinases, les phosphatases ont pour effet de déphosphoryler la protéine Tau. Les phosphatases 1, 2A et 2B (calcineurine) sont présentes dans le cerveau humain et sont capables *in vitro* de déphosphoryler la protéine Tau. L'utilisation d'inhibiteurs des phosphatases 2A et 2B résulte en une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau.

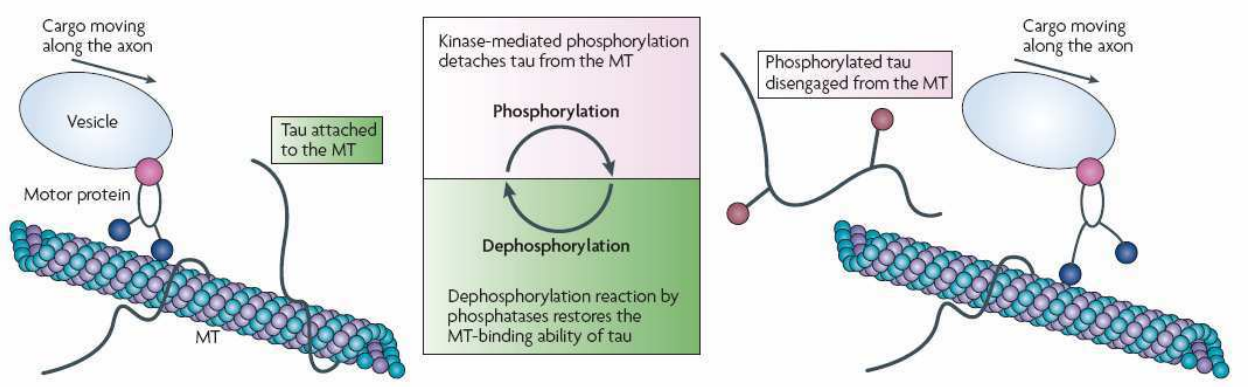


Figure 14: Balance phosphorylation/déphosphorylation de la protéine Tau

L'association des protéines Tau sur les microtubules est liée à une balance entre phosphorylation et déphosphorylation qui permet la mobilité des éléments intracellulaires sur le cytosquelette. D'après Ballatore 2007.

La phosphorylation pathologique de la protéine Tau regroupe deux processus distincts. D'une part, la protéine Tau est phosphorylée sur des sites qui ne sont pas phosphorylés en conditions physiologiques: il s'agit de la phosphorylation anormale de la protéine Tau. D'autre part, au cours de la MA, certains sites de phosphorylation physiologiques sont phosphorylés de manière plus importante: il s'agit de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.

Il existe 85 sites potentiels de phosphorylation sur l'isoforme de Tau la plus longue (Sergeant 2008). Seuls 71 sites sont effectivement phosphorylés en conditions physiologiques ou pathologiques. Les principaux sites se situent sur des résidus Sérine et Thréonine, la plupart situés à proximité des domaines d'interaction avec les microtubules et en particulier dans la région riche en Proline. La phosphorylation de ces résidus module fortement l'affinité de Tau pour les microtubules. Ainsi la phosphorylation de Tau au niveau des résidus Sérine 262 et 356 et Thréonine 231 situés dans le domaine de liaison des MT inhibe la capacité de la

protéine Tau à se lier aux MT. De la même façon, la phosphorylation pathologique des résidus dans la région riche en Proline diminue fortement la capacité de liaison Tau/MT (Liu 2007, Brandt 2005).

2.2.4.2. Protéolyse partielle

La protéolyse partielle de la protéine Tau pourrait être impliquée dans un processus d'agrégation menant à l'apparition des DNF dans la MA (Meraz-Rios 2010). Ainsi, il a été montré que la protéine Tau pouvait être clivée aussi bien en position N-terminale qu'en position C-terminale. Cette protéolyse partielle induirait des changements conformationnels de Tau conduisant à son agrégation (Binder 2005). D'autres études indiquent que Tau serait substrat des caspases 3 et 6 et que son clivage induirait l'apoptose neuronale (Fasulo 2000, Horowitz 2004). Suivant la sévérité de la maladie, le clivage de la protéine interviendrait à différents niveaux: le clivage aurait lieu dans un premier temps en partie C-terminale au niveau de l'acide aspartique en position 421, puis rapidement l'extrémité N-terminale serait clivée à son tour, et enfin le clivage de la partie C-terminale au niveau de l'acide glutamique en position 391 laisserait un peptide initiant l'agrégation (Binder 2005).

2.2.4.3. Glycosylation

La glycosylation de Tau est une modification post-traductionnelle permettant l'ajout d'oligosaccharides sur les chaînes latérales de la protéine. La N-glycosylation des protéines Tau situées dans les PHF est augmentée par rapport aux protéines Tau normales (Wang 2008). La glycosylation permettrait de faciliter la phosphorylation de Tau par les kinases cdk5 et GSK3β au niveau de différents sites de phosphorylation anormale (Liu 2002).

2.2.4.4. Glycation

La glycation permet d'établir une liaison covalente entre un sucre et la partie N-terminale d'une protéine. La réaction est de type non enzymatique et entraîne la formation de produits finaux de glycation avancée (AGEs pour Advanced Glycation End products). Bien que cette modification ne soit pas exclusive à la MA, ni même à la protéine Tau, la présence d'espèces glyquées au sein des PHF suggère un lien entre la glycation et la formation des DNF (Ledesma 1994). La glycation de Tau au niveau du domaine de liaison aux MT potentialise l'agrégation de la protéine (Ledesma 1998).

2.2.4.5. Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine jouant un rôle de régulation dans les processus de protéolyse de protéines endommagées ou à durée de vie limitée. Ainsi les protéines poly-ubiquitinées sont ciblées pour être ensuite dégradées par l'intermédiaire d'un système ubiquitine-protéasome. L'ubiquitine est fortement liée à la protéine Tau (Manetto 1988). L'ubiquitination de Tau serait due à l'action de l'ubiquitine ligase CHIP sur les formes phosphorylées de la protéine dans les PHF. Etant donné son importance dans la voie de dégradation de la protéine Tau phosphorylée, ce processus pourrait être au cœur de l'agrégation de la protéine Tau. En effet, en cas de défaillance de ce système ou en cas d'augmentation trop élevée de la forme hyperphosphorylée de Tau, la dégradation de Tau est remise en cause et conduit à l'augmentation du nombre de protéines Tau hyperphosphrylées libres (Dickey 2006).

2.2.5. Topographie des lésions

L'ordre d'apparition des DNF dans le cerveau au cours du développement de la MA est stéréotypé, séquentiel et hiérarchique, allant de la région hippocampique aux aires associatives puis aux aires corticales primaires (Delacourte 1999 et 2002). La progression topographique des lésions peut ainsi se distinguer en 10 stades. Les lésions neurofibrillaires apparaissent dans un premier temps dans le cortex transentorhinal et entorhinal, puis dans l'hippocampe. Le cortex associatif est ensuite affecté avec une atteinte du cortex temporal antérieur, inférieur puis moyen. Toutes les aires du cortex associatif (polymodal) présentent alors des lésions de type DNF. Le cortex primaire est touché tardivement avec une atteinte qui se fait en premier lieu au niveau du cortex frontal puis qui se généralise à toutes les régions corticales. La progression temporelle des lésions Tau-positives est bien corrélée à la progression des symptômes cliniques (Nagy 1995). Les pertes de mémoire se font sentir précocement avec l'atteinte de la région hippocampique puis les tâches sous le contrôle des aires associatives sont affectées (aphasie, troubles de la mémoire sémantique), enfin des troubles comme les troubles du comportement, l'apraxie ou l'agnosie se font ressentir avec l'atteinte des aires corticales primaires (frontale, temporale et pariétale). La figure 15 décrit la progression et la densité relative des DNF dans différentes zones du cerveau suivant la sévérité de la pathologie.

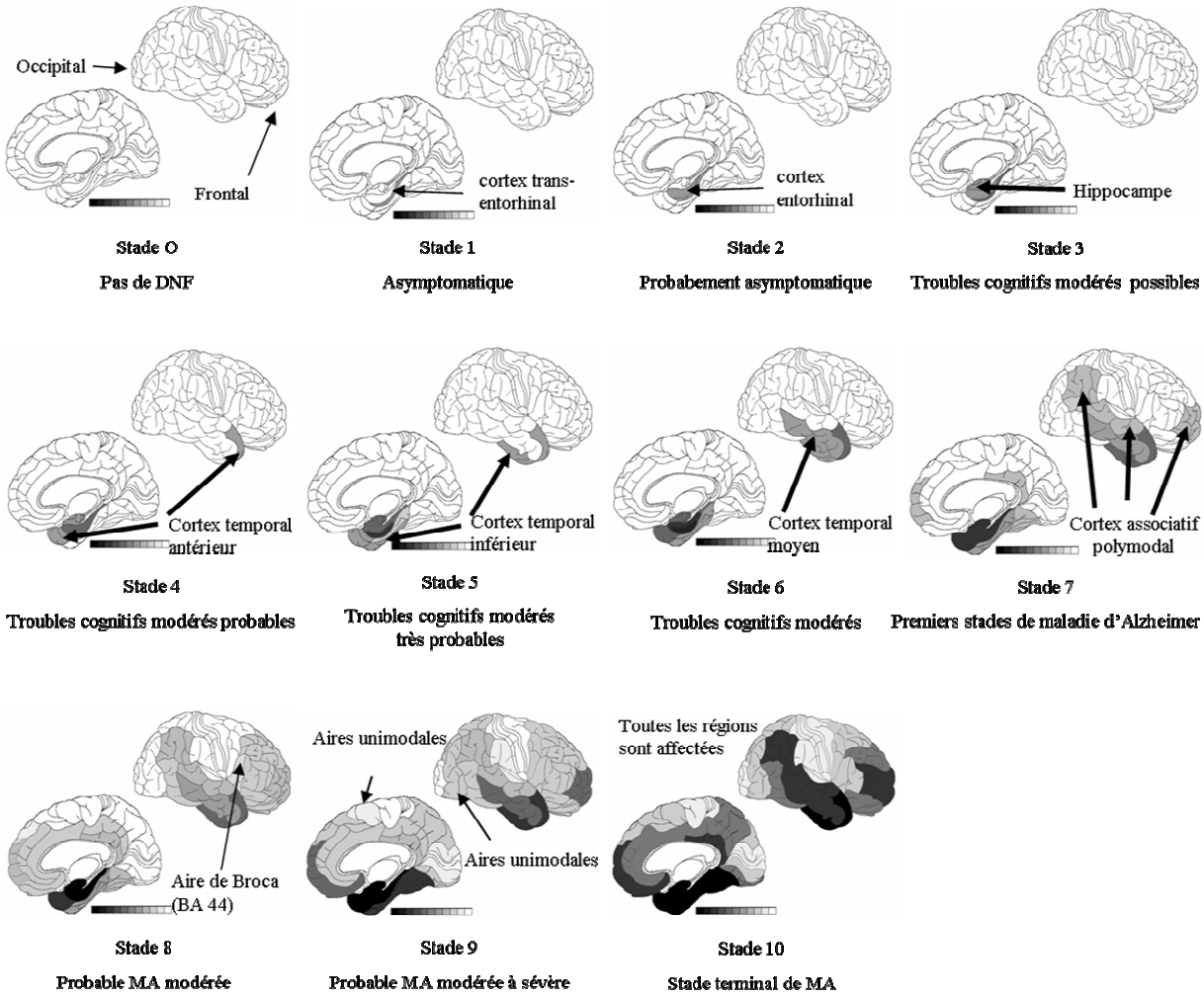


Figure 15: Evolution de la distribution des dégénérescences neurofibrillaires dans le tissu cérébral au cours du développement de la maladie d'Alzheimer

La progression des lésions neurofibrillaires se distingue en 10 stades. La progression des lésions suit un parcours stéréotypé de la région hippocampique vers les aires corticales associatives puis vers les aires corticales primaires. MA: Maladie d'Alzheimer, DNF: Dégénérescences neurofibrillaires. D'après Delacourte http://www.alzheimer-adna.com/Stades/10stadesFr.html .

3. Les lésions associées

3.1. Perte neuronale

On admet qu'il n'y a pas de perte neuronale néocorticale globale dans la MA (Regeur 1994). Cependant on observe une perte neuronale localisée dans l'hippocampe, le cortex cérébral et le complexe amygdalien (Simic 1997). La localisation de cette perte neuronale trouve un lien logique avec la présence de lésions tissulaires microscopiques dans ces régions, notamment la présence de DNF. Ainsi, on a pu mettre en évidence que la perte neuronale est statistiquement liée à la densité de DNF (Grignon 1998).

Les points de divergence concernant l'importance de la perte neuronale sont nombreux. Pour certains auteurs, la perte neuronale est précoce et importante, et donc est un élément causal de la maladie. Pour d'autres, il s'agit d'un événement qui survient tardivement, et donc fait partie des conséquences de processus physiopathologiques précédents.
Les mécanismes menant à la mort neuronale sont également très discutés. Les DNF pourraient être la cause directe de cet événement. D'une part, la mort neuronale est plus importante dans les zones de forte densité de DNF. D'autre part, il est fréquent d'observer des « fantômes de DNF » ou « Ghost tangles » dans l'espace précédemment occupé par les neurones. La somme des « Ghost tangles » et des neurones fonctionnels est proche du nombre total de neurones comptabilisés chez des individus normaux (Cras 1995).

3.2. Perte synaptique

La perte synaptique est proportionnellement plus élevée que la perte neuronale. Elle est aujourd'hui considérée comme un bon marqueur de l'évolution de la pathologie. Il a été montré une diminution du nombre de synapses, compensée par une augmentation de leur taille et de leur surface d'apposition (Scheff 1990). La quantité de certains composants vésiculaires comme la synaptophysine est diminuée de 30% lors de la MA. La réduction du nombre de synapses est très bien corrélée à l'évolution des symptômes observés dans la MA (Terry 1991).

4. Relations entre dégénérescences neurofibrillaires et agrégats de peptides amyloïdes

4.1. Topographie relative des lésions

L'ordre d'apparition relatif entre les dépôts de peptides amyloïdes et les DNF reste encore très discuté. Les observations des tissus cérébraux de patients atteints de la MA démontrent la précession des DNF sur les dépôts amyloïdes dans la plupart des cas (Braak 1991). L'analyse des données issues de l'étude de Braak et Braak citée précédemment a permis d'établir l'ordre d'apparition des lésions tissulaires en fonction de l'âge des patients (Duyckaerts 1997). A partir de 40 ans, on trouve les premières lésions de type DNF dans le cortex enthorhinal. A 47 ans, la moitié de la population possèderaient des lésions neurofibrillaires cérébrales. Les premières lésions amyloïdes apparaîtraient en moyenne à l'âge de 62 ans dans le néocortex. La moitié de la population auraient des lésions amyloïdes à l'âge de 74 ans. Dans les stades précoces de la maladie, des DNF ont pu être mis en évidence en l'absence de dépôts amyloïdes. L'observation inverse est plus rare: la présence des dépôts amyloïdes sans DNF est plutôt retrouvée chez les patients atteints de formes génétiques de la MA. L'hypothèse

amyloïde ne prend pas en compte ces données. La cascade amyloïde définit l'Aβ comme étant l'élément initiateur de toutes les atteintes physiopathologiques liées à la MA (Hardy 1992). Selon cette dernière hypothèse, les formes solubles de l'Aβ, peu détectables par les techniques d'histologie classique, pourraient induire la pathologie neurofibrillaire. Celle-ci serait alors visible avant les dépôts amyloïdes.

La cascade amyloïde est cependant souvent remise en cause en raison des observations provenant de l'anatomo-pathologie humaine. La progression anatomique des dépôts amyloïdes ne se superpose pas à l'évolution des déficits cognitifs des patientes Alzheimer. En revanche, la progression anatomique des DNF dans le cerveau des patients atteints de la MA est corrélée aux déficits cognitifs mesurés lors des évaluations neuropsychologiques (Nagy 1995). Cette seule observation dans la progression relative des lésions les unes par rapport aux autres laisse à penser que les DNF prennent une part importante dans les processus cytotoxiques liés à la MA, ou tout du moins que le peptide amyloïde n'est pas le seul acteur responsable de la pathologie.

4.2. Synergie Tau/Aβ

En se basant sur la progression relative des PA et des DNF, certains auteurs ont proposé un mode d'action synergique entre les deux types de lésions, plus vraisemblable que l'implication d'un seul type de lésion (Ittner 2011). Plusieurs observations laissent à penser qu'un lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie neurofibrillaire existe. Dans l'aspect même des plaques amyloïdes, on peut retrouver un lien entre l'Aβ et les protéines Tau. Les plaques amyloïdes matures sont composées des deux types de lésions: le "cœur" de la plaque est composé de peptides Aβ agrégés, mais la couronne qui l'entoure est composée de prolongements axonaux endommagés présentant des lésions Tau positives. L'action combinée des deux lésions pourrait se faire selon 3 possibilités. La première voie est décrite par la cascade amyloïde. Selon cette hypothèse le peptide Aβ cause la pathologie neurofibrillaire et induit à terme la toxicité. La seconde voie met en avant le rôle de médiateur de Tau dans la toxicité induite par l'Aβ. Ainsi la présence de Tau permettrait l'action toxique de l'Aβ sur les neurones mais l'Aβ ne serait pas directement impliquée dans le développement de la pathologie neurofibrillaire. La dernière possibilité fait intervenir les deux acteurs de manière directe et en proportion équivalente. L'Aβ et les protéines Tau phosphorylées agiraient de façon coordonnée pour induire des dommages sur les cellules environnantes. Leur action serait non concertée mais les deux types de lésions s'amplifieraient l'une l'autre.

La seconde possibilité impliquant le rôle de médiateur de la protéine Tau dans la toxicité induite par l'Aβ semble être la plus répandue à l'heure actuelle (Ittner 2011). Pour bien comprendre cette hypothèse, il faut considérer la localisation des protéines Tau hyperphosphorylées en fonction de l'état de sévérité de la pathologie (Figure 16). Aux stades légers de la pathologie, l'Aβ induirait une toxicité faible au niveau des dendrites et du corps cellulaire des neurones tandis que les protéines Tau agiraient dans les axones. Au cours de l'évolution de la MA, on trouve de plus en plus de DNF notamment dans le corps cellulaire des neurones et dans les dendrites, là où l'Aβ et les protéines Tau hyperphosphorylées pourraient avoir une action synergique (Figure 16). Ainsi, des souris transgéniques possédant le gène APP mais pas celui codant la protéine Tau, ne présentent pas les signes de toxicité avancée relevés chez les souris possédant les deux types de lésions. De la même façon, les neurones en culture n'exprimant pas le gène Tau ne sont pas affectés par la toxicité induite par les peptides Aβ.

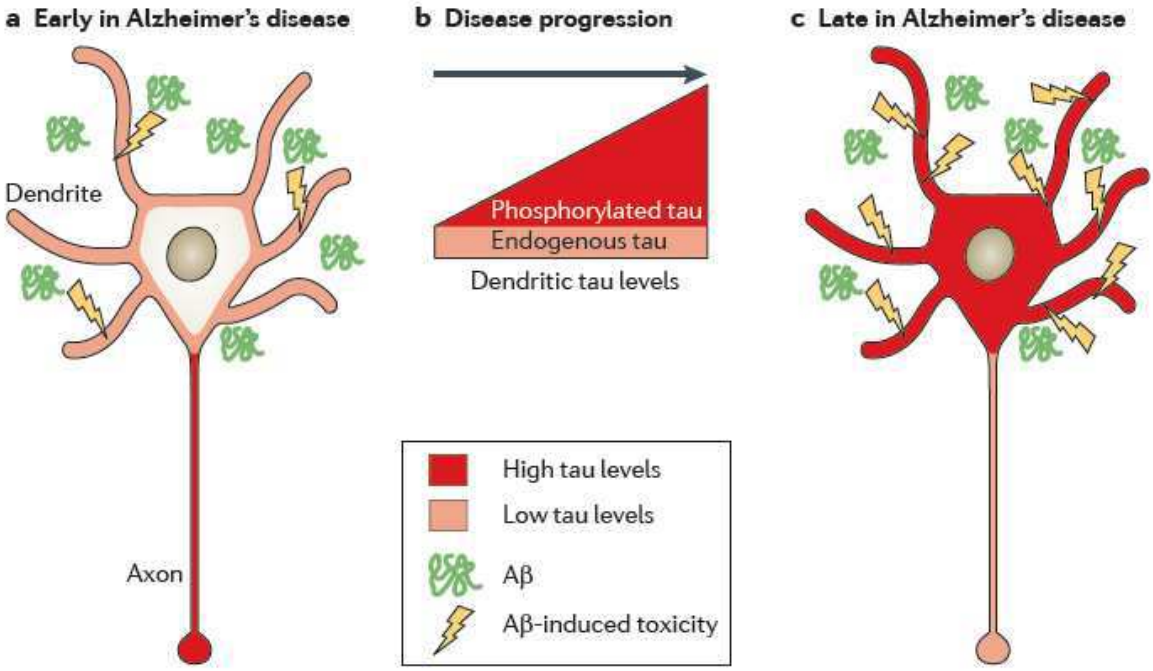


Figure 16: Action combinée de l'Aβ et des DNF dans la MA

La localisation des DNF varie en fonction de la sévérité de la pathologie. D'après Ittner 2011.

C. Suivi de l'évolution de la MA

1. Diagnostic

1.1. Diagnostic probabiliste

La maladie d'Alzheimer est définie par l'association d'un syndrome démentiel d'évolution progressive et de la présence de lésions cérébrales caractéristiques que sont les PA et les DNF.

Le diagnostic fait donc intervenir deux critères distincts: l'un relève de l'examen clinique et reflète l'état cognitif et mental du patient, l'autre critère est établi après le décès du patient lors de l'examen anatomo-pathologique pour quantifier l'atteinte lésionnelle du tissu cérébral.

En l'absence de marqueurs biologiques suffisamment efficaces, le diagnostic est constitué principalement du critère clinique. Dans ce contexte et malgré les nombreux outils à disposition, le diagnostic ne peut être établi avec certitude du vivant du patient. Le diagnostic de la MA reste encore aujourd'hui probabiliste.

1.2. Les critères diagnostiques

De nombreux critères diagnostiques ont été proposés pour réaliser les examens cliniques. Parmi ceux-ci les critères du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux (DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994) et du National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke / Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA 1984) sont les plus couramment utilisés et admis.

Les critères DSM-IV concernent le diagnostic des démences en général (et pas seulement de la MA). Le syndrome démentiel est mis en évidence par:

- l'apparition et l'évolution progressive et continue de déficits cognitifs multiples dont une altération de la mémoire et d'au moins une autre fonction cognitive suivante: aphasie, apraxie, agnosie, perturbation des fonctions exécutives.
- un retentissement dans les activités de la vie quotidienne.

Les critères du NINCDS-ADRDA sont plus orientés sur le diagnostic de la MA et permettent la classification des patients entre MA possible, probable ou certaine. Ces critères suivent et confortent les critères du DSM-IV pour l'établissement du diagnostic de syndrome démentiel. Ils permettent d'y associer des examens neuropsychologiques et psychiatriques. La caractérisation de l'évolution de la maladie ainsi que l'exclusion d'un autre diagnostic permettent de retenir le diagnostic de MA probable.

La démarche diagnostique comprend donc deux temps: la mise en évidence d'un syndrome démentiel à l'aide des critères du DSM-IV dans un premier temps puis la classification du patient en ce qui concerne la possibilité de développer une MA.

Concrètement, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) a établi des recommandations pour la démarche diagnostique de la MA (ANAES 2008). Ces recommandations, basées sur les critères du DSM-IV et du NINCDS-ADRDA, permettent d'établir un parcours de prise en charge pour le diagnostic des patients consultant pour des troubles de la mémoire ou des troubles cognitifs.

Tout d'abord, un entretien avec le patient et un accompagnant doit être réalisé afin de rassembler des informations sur la nature, l'importance et l'évolution des troubles ressentis, sur l'existence d'antécédents médicaux et familiaux, sur la prise de traitement médicaux ainsi que sur le retentissement des troubles perçus sur les activités du quotidien et notamment s'il y a une atteinte de l'autonomie du patient à réaliser ces mêmes activités. Différents outils peuvent être utilisés afin de réaliser l'évaluation fonctionnelle (atteinte de l'autonomie) ou l'évaluation comportementale (troubles du comportements et dépression). L'IADL (Instrumental Activities of the Daily living) permet d'apprécier le retentissement des troubles sur la vie quotidienne. L'échelle GDS (Geriatric Depression Scale) permet de rechercher un syndrome dépressif. Le NPI (NeuroPsychiatric Inventory) et le FBS (Frontotemporal Behavioral Scale) sont utilisés pour l'évaluation des troubles psychologiques et comportementaux.

Un examen clinique doit être pratiqué afin de déterminer certains paramètres physiologiques comme le poids pour rechercher des troubles de la nutrition ou encore la pression artérielle. Un diagnostic de maladie de Parkinson, de démence à corps de Lewy ou de démence vasculaire doit être écarté. L'évaluation neuropsychologique permettant d'évaluer les fonctions supérieures est primordiale. Parmi les tests pouvant être utilisés, on peut citer: le Mini-Mental State Examination, le Critical Dementia Rate, le test de fluence verbale, le Memory Impairment Screen, le 7 minutes test, le rappel des 5 mots. Il en existe de nombreux autres et le choix des tests mis en œuvre reste à l'appréciation du professionnel de santé. Pour donner un exemple, le Mini Mental State Examination (MMSE) permet d'évaluer les performances cognitives de manière générale. C'est un des tests les plus couramment pratiqués. Il comprend une série de question avec une note globale sur 30. Un score inférieur à 23 révèle une dysfonction cognitive et doit mener à un diagnostic plus complet. Un score entre 27 et 24 est à interpréter en fonction de l'âge et du niveau socio-culturel et peut conduire à un examen plus approfondi. Au dessus de 28 points, le patient ne présente pas de troubles cognitifs majeurs.

Si l'ensemble des examens est normal malgré la plainte mnésique, le patient sera amené à refaire une évaluation plus tard. Sinon, des examens paracliniques doivent être réalisés. Ces examens comprennent un examen biologique (dosage sanguin) et un examen d'imagerie (imagerie par résonance magnétique ou imagerie nucléaire) dans le but de déceler une autre maladie pouvant être à l'origine des troubles (diagnostic différentiel). Le détail des examens d'imagerie pouvant être proposés est décrit plus loin dans ce manuscrit.

1.3. Spécificité et sensibilité du diagnostic

Le diagnostic de la MA établi du vivant du patient est probabiliste. A ce titre, la spécificité et la sensibilité du diagnostic est évalué par rapport au diagnostic de certitude comprenant l'évaluation clinique et l'évaluation anatomo-pathologique. L'analyse faite ici concerne essentiellement l'examen clinique. Le diagnostic clinique, établi selon les critères du DSM-IV et du NINCDS-ADRDA, permet de réaliser le diagnostic de MA probable avec une sensibilité globalement satisfaisante de 81% et avec une spécificité de l'ordre de 70% (Knopman 2001). Cependant, il existe une très grande disparité dans les performances de l'examen clinique prenant en compte la formation et la connaissance de la maladie par le praticien qui réalise le diagnostic, la mise en œuvre de nouveaux critères ou de nouveaux outils d'évaluation. A l'heure actuelle, l'évaluation neuropsychologique est réalisée au moyen d'épreuves de rappel libre et de rappel indicé mettant en évidence des troubles de l'encodage, de stockage et de récupération de l'information. Ces troubles sont typiques d'un dysfonctionnement de l'hippocampe et révèlent un lien avec la MA. Chez les sujets âgés sains, les difficultés mnésiques seraient plus associées à un dysfonctionnement du cortex frontal.

De nombreuses études mettent en avant les vertus de l'examen clinique: spécificité de 100%, détection des premiers symptômes cliniques jusqu'à 14 ans avant la survenue de la maladie avant le diagnostic tel qu'il est réalisé aujourd'hui (Amieva 2008).

1.4. Retard et sous-diagnostic de la MA

Malgré les progrès réalisés dans ce domaine, le diagnostic de la MA reste problématique. Le retard de diagnostic est estimé à 24 mois en moyenne en France et à 20 mois en Europe (Bond 2005). Chez le sujet jeune par exemple, l'apparition des symptômes est souvent mise sur le compte d'autres causes: fatigue, aspect bénin de certaines pertes de mémoire souvent banalisées. Ainsi le sujet attend d'avoir des problèmes cognitifs importants pour consulter. La Facing Dementia Survey montre que seuls 40% des patients consultent à un stade de démence léger (Bond 2005). La pathologie est sous diagnostiquée et le diagnostic souvent réalisé avec

retard. On considère que seulement 50% des individus atteints de la MA sont diagnostiqués en France (Rapport de l'OPEPS, Gallez 2005). Le sous-diagnostic peut s'expliquer par différents éléments. La MA est une pathologie qui affecte principalement les personnes âgées. Pour le grand public, les symptômes de la MA sont souvent mis sur le compte du vieillissement. La perte de mémoire notamment est considérée à tort comme faisant partie du vieillissement normal. La progression des symptômes est également à prendre en compte. L'entourage est donc souvent mal disposé à inscrire un proche dans une démarche diagnostique. L'individu concerné, quant à lui, est victime d'une perte de conscience de son état (anosognosie). Pour des raisons encore mal connues, le sujet a du mal à évaluer ses propres performances et souvent ne va pas faire les démarches nécessaires.

Le diagnostic de la MA est notamment problématique aux stades extrêmes de la maladie. Au stade prédémentiel, l'individu n'est pas considéré comme malade mais il existe de fortes présomptions de développement de MA dans l'avenir. La prise en charge de cet individu reste problématique pour l'instant. Aucun traitement ne peut lui être proposé et on ne peut prédire quand il développera la maladie, s'il la développe. Au stade tardif de la maladie, les sujets âgés présentent souvent plusieurs pathologies et il est alors difficile d'établir un diagnostic clair.

Le diagnostic différentiel est également un problème d'envergure. La distinction entre la MA et d'autres formes de démences est parfois difficile à réaliser. Ceci est d'autant plus vrai que la MA survient majoritairement chez des personnes âgées chez qui plusieurs pathologies sont souvent associées. Ainsi, la MA est régulièrement associée à des pathologies vasculaires. Les accidents vasculaires cérébraux sont plus fréquents chez les patients atteints de la MA et l'on observe souvent des cas d'angiopathie amyloïde. La MA est également régulièrement associée à des démences à corps de Lewy et à des démences frontotemporales.

1.5. Vers de nouveaux critères diagnostiques

De nouvelles définitions de la maladie d'Alzheimer ont récemment vu le jour afin de mieux caractériser les patients, pour les orienter vers une prise en charge plus spécifique. La définition proposée par Dubois *et al* (Dubois 2007, 2010) met en avant les problèmes inhérents aux critères du DSM-IV et du NINCDS-ADRDA. Les critères de cette classification ont été établis en 1984 alors que de nombreux aspects morphologiques de la MA étaient peu connus. La compréhension des phénomènes biologiques responsables du développement de la maladie a beaucoup évolué depuis. Ce collectif de chercheurs mené par le professeur Dubois

propose ainsi d'ajouter de nouveaux critères biologiques ou morphologiques pour renforcer l'examen clinique dans l'établissement du diagnostic.

Le diagnostic de MA probable repose sur la mise en évidence d'un trouble significatif de la mémoire épisodique associé à l'un des critères suivants: une modification des structures temporales internes en imagerie par résonance magnétique, une modification du taux des biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien et un profil métabolique spécifique en tomographie par émission monophotonique ou en tomographie par émission de positons. D'après les auteurs, cette nouvelle définition devrait permettre d'améliorer l'efficacité du diagnostic d'une part et de fournir des critères diagnostiques plus objectifs d'autre part. Cependant, l'apport de ces outils complémentaires reste encore limité aujourd'hui de part leur faible spécificité/sensibilité et par leur coût relativement élevé par rapport à l'examen clinique (voir chapitre C.3.).

1.6. Conclusion

La maladie d'Alzheimer est définie par l'association d'un syndrome démentiel d'évolution progressive et la présence de lésions cérébrales caractéristiques. Ce dernier critère ne peut être mis en évidence avec précision et certitude que par l'examen anatomo-pathologique *post mortem*. Le diagnostic reste donc probabiliste. Il existe de nombreux problèmes concernant le diagnostic en France. Ces problèmes sont plus liés à des dysfonctionnements structuraux du parcours de santé et à un manque de politique de prise en charge de la maladie qu'à un manque réel d'efficacité des moyens diagnostiques. Les critères diagnostiques ne cessent d'évoluer mais l'examen clinique reste l'élément le plus pertinent pour l'établissement de ce diagnostic.

2. Le dosage de biomarqueurs

La recherche de nouveaux moyens diagnostiques a permis d'identifier des marqueurs biologiques dosables dans le liquide céphalorachidien (LCR). De nombreux biomarqueurs sont à l'étude à ce jour, cependant trois principaux marqueurs sont mis en avant par la communauté scientifique à des fins diagnostiques: le peptide Aβ 1-42, les protéines Tau totales et les protéines Tau hyperphosphorylées (pTau). La présence de deux marqueurs sur trois chez un patient au stade de démence légère à modérée permettrait de déterminer s'il va ou non progresser vers la MA. La combinaison de ces trois biomarqueurs permettrait, dans le meilleur des cas, d'obtenir une sensibilité de 95% et une spécificité de 87% (Hansson 2006). Pour l'instant, les avancées concernant le dosage de biomarqueurs sont limitées à des

diagnostics au stade de démence modérée. L'objectif affiché de cette technique est de réaliser un diagnostic fiable dès le stade prédémentiel.

2.1. Peptide Aβ 1-42

La diminution de la quantité de peptides Aβ 1-42 dans le LCR permettrait d'identifier le développement de la maladie avec une sensibilité proche de 85% et une spécificité de 90% (Blennow 2004). Cette baisse de la quantité d'Aβ serait due à l'accumulation du peptide insoluble dans les plaques amyloïdes, ce qui induirait une diminution de son passage vers le LCR.

2.2. Protéines Tau totales

L'augmentation de la quantité de protéines Tau totales dans le LCR permettrait de diagnostiquer la MA avec une sensibilité supérieure à 80% et une spécificité de 90% (Blennow 2004). Cette augmentation des quantités de protéines Tau serait corrélée à l'évolution croissante de l'atteinte neuronale par le biais des DNF. Au cours du développement de la pathologie, la protéine Tau est protéolysée. Le test immuno-enzymatique dédié à la recherche de protéines Tau dans le LCR permet de détecter une grande partie de ces fragments de protéine Tau.

2.3. Protéines Tau hyperphosphorylées

En plus d'être hydrolysée, la protéine Tau est phosphorylée de manière pathologique au cours de la MA. La détection des formes anormalement phosphorylées de la protéine Tau permet de mettre en évidence une augmentation de la quantité de pTau dans le LCR des patients atteints de la MA. Le diagnostic réalisé grâce à ce test permet d'obtenir une sensibilité proche de 80% et une spécificité de 92% (Blennow 2004). Les acides aminés anormalement phosphorylés les plus couramment recherchés sont Thr 181, Thr 231 et Ser 199.

3. L’imagerie

L'imagerie de la MA est destinée à deux applications majeures. La première est l'étude de la pathologie d'un point de vue fondamental. L'imagerie permet de suivre les lésions survenant au cours du développement de la pathologie et permet donc de mieux comprendre l'évolution de cette maladie. La seconde application est tournée vers la clinique puisque l'imagerie est de plus en plus mise à contribution pour l'établissement du diagnostic de la MA (Dubois 2010). Bien qu'aujourd'hui, l'imagerie ne soit pas en mesure d'établir le diagnostic définitif de la MA,

elle est de plus en plus utilisée pour établir le diagnostic différentiel ou venir appuyer le diagnostic clinique réalisé grâce aux tests psycho-comportementaux.
Deux modalités d'imagerie sont aujourd'hui disponibles pour l'étude de la MA: l'imagerie nucléaire et l'imagerie par résonance magnétique. Ces deux techniques permettent de caractériser la maladie sur le plan anatomique et fonctionnel.

3.1. Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique ou IRM est une technique basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire. L'application d'un champ magnétique modifie le statut électromagnétique de certains atomes, comme l'hydrogène dans l'eau (H_2O) notamment. Lors du retour à l'état stable, on mesure le signal électromagnétique émis. Ce signal varie en fonction du tissu considéré et permet de reconstruire des images en 2D ou en 3D de l'intérieur d'un corps. Cette technique est bien adapté à l'étude de tissus "mous" comme le tissu cérébral ce qui en fait une technique de choix pour l'étude de la MA.

3.1.1. L'IRM anatomique

L'atrophie évolue avec la sévérité de la MA et est superposable à l'atteinte lésionnelle des DNF (Whitwell 2008). L'IRM anatomique permet de caractériser et quantifier la densité et le volume de la substance grise cérébrale *in vivo*. De la même manière que l'histopathologie, cette modalité permet ainsi d'étudier de façon satisfaisante les profils d'atrophie des patients atteints de la MA de leur vivant.
Différentes études ont ainsi pu mettre en évidence une atrophie sélective du lobe temporal interne et plus particulièrement de l'hippocampe et du cortex entorhinal chez des patients atteints de la MA (Chételat 2003). L'atrophie de l'hippocampe chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer mesurée par IRM est estimée entre 20 et 52% par rapport à des sujets sains. L'IRM permettrait également de classifier les sujets sains, les sujets atteints de troubles cognitifs modérés et les patients atteints de la MA. L'atrophie serait moins forte chez les sujets atteints de troubles cognitifs modérés que chez les patients atteints de la MA avec seulement 11 à 23% d'atrophie de l'hippocampe par rapport aux sujets sains (Chételat 2003). Les profils d'atrophie mis en évidence par IRM permettraient également de déterminer les patients allant évoluer d'un stade prédémentiel (troubles cognitifs modérés) à un stade de MA et ceux qui n'évolueront pas (Mosconi 2007).

3.1.2. IRM du tenseur de diffusion

L'IRM du tenseur de diffusion (ITD) est une modalité d'imagerie qui repose sur l'étude des propriétés intrinsèques des mouvements de l'eau (Le Bihan 2001). Dans un tissu, les molécules d'eau se déplacent d'une certaine façon selon le milieu environnant. La substance blanche riche en fibres axonales assure la connectivité entre les différentes régions du cerveau et dans ces fibres, le déplacement de l'eau correspond à une diffusion anisotropique caractérisable par ITD. L'ITD mesure le taux de diffusion des molécules d'eau dans le tissu (diffusibilité) et leur direction (directionnalité). Une modification de ces deux mesures correspond à une altération de l'intégrité des fibres axonales et donc à une altération de la connectivité inter-régionale. La perte des neurones corticaux observée lors de la MA s'accompagne inévitablement d'une dégénération axonale dans les faisceaux de substance blanche. Cette dégénération peut être mise en évidence par l'ITD. De nombreuses études ont montré une augmentation de la diffusibilité et une diminution des valeurs de directionnalité dans la plupart des régions contenant de la substance blanche dont les lobes temporaux et pariétaux et dans une moindre mesure le lobe frontal (Filippi 2010). Des anomalies de la substance blanche peuvent être mises en évidence par ITD dans le splenium du corps calleux, le cingulum postérieur, le faisceau unciné, le faisceau fronto-occipital inférieur, le faisceau longitudinal inférieur et le faisceau longitudinal supérieur (Figure 17).

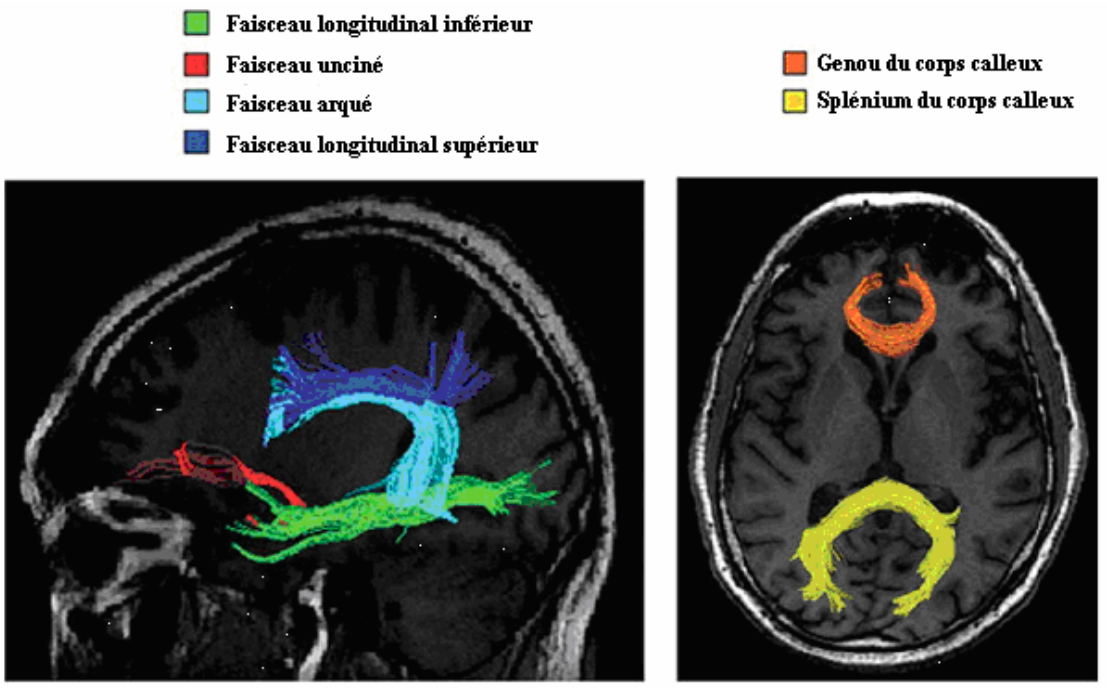


Figure 17: Représentation des faisceaux de substances blanches cérébrales

Reconstruction de faisceaux de substance blanche chez un sujet sain en utilisant l' IRM du tenseur de diffusion. D'après Filippi 2010.

L'ITD permet ainsi d'apporter des informations supplémentaires sur l'état de connectivité fonctionnelle entre les structures cérébrales. Cette technique est aujourd'hui essentiellement utilisée à des fins fondamentales mais pourrait à l'avenir présenter un intérêt diagnostique puisqu'elle pourrait permettre de distinguer les "converteurs" (sujets atteints de troubles cognitifs modérés qui évoluent vers une MA) et les "non converteurs" (sujets atteints de troubles cognitifs modérés qui n'évoluent pas vers une MA) avec une bonne performance (Kantarci 2005).

3.2. L'imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire est une technique d'imagerie moléculaire dont le principe repose sur l'administration, le suivi et l'analyse de la répartition dans l'organisme de molécules marquées à l'aide d'isotopes radioactifs, spécifiques d'une cible, d'une fonction ou d'un processus physiologique particulier. Il existe deux modalités en imagerie nucléaire: la TEP (Tomographie par Emission de Positons) et la TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique). L'utilisation de l'une ou l'autre modalité se fait en fonction de l'isotope radioactif choisi.

3.2.1. Etude fonctionnelle

Les études fonctionnelles dans la MA font essentiellement appel à deux radiotraceurs: le ^{18}F-FDG ou 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose qui marque la consommation cérébrale de glucose et le ^{99m}Tc-HMPAO ou ^{99m}Tc-hexaméthylpropylène-amineoxime qui marque le débit sanguin cérébral. Ces deux radiotraceurs permettent de mettre en évidence des modifications fonctionnelles de certaines structures cérébrales chez les patients atteints de MA: hypo-métabolisme pour le ^{18}F-FDG et hypo-perfusion pour le ^{99m}Tc-HMPAO. L'hypo-métabolisme et l'hypo-perfusion touchent dans un premier temps et de manière privilégiée le cortex temporo-pariétal et le gyrus cingulaire postérieur (Demetriades 2002). L'atteinte fonctionnelle de ces deux régions mise en évidence par l'imagerie est corrélée avec la progression de la MA (Chételat 2003). Il a ainsi été montré qu'un profil d'atteinte fonctionnelle asymétrique entre les deux hémisphères au niveau du cortex temporo-pariétal correspond à un stade débutant ou prédémentiel de MA. Cette asymétrie disparaît par la suite avec l'évolution de la MA, signe d'un passage à un stade sévère de la maladie. Chez les patients atteints d'un trouble cognitif modéré, la quantification du ^{18}F-FDG de la région temporo-pariétale permettrait de distinguer les "converteurs" des "non converteurs". Les modifications de distribution de ces deux traceurs dans les cortex temporo-pariétal et cingulaire postérieur sont plus caractéristiques que

celles observées dans la région hippocampique. En effet, contrairement à l'atteinte anatomique, l'atteinte fonctionnelle semble gagner la région hippocampique de manière plus modérée et plus tardive (Chételat 2006, Mosconi 2005). Cette observation peut sembler discordante avec les résultats obtenus en IRM. Cependant, ces différences pourraient s'expliquer par une atteinte à distance via les connexions entre les différentes régions concernées. Les altérations précoces de l'hippocampe (DNF et atrophie) induiraient une dysconnexion de cette région avec les zones corticales associées. Cette dysconnexion résulterait en une baisse d'activité et donc en un hypo-métabolisme et une hypo-perfusion dans ces régions, notamment au niveau des cortex temporo-pariétal et cingulaire postérieur. La différence entre IRM et imagerie nucléaire fonctionnelle serait liée à la plasticité élevée de l'hippocampe sur le plan structurel (mise en évidence précocement en IRM anatomique) et à des processus de compensation importants sur le plan fonctionnel (mis en évidence de façon plus tardive) (Chételat 2006). La performance de ces deux marqueurs pour le diagnostic est bonne relativement aux autres outils diagnostiques. La sensibilité du ^{18}F-FDG est en effet estimée à plus de 90% et sa spécificité à plus de 70% (Small 2004). Les données concernant les performances du ^{99m}Tc-HMPAO sont plus contrastés avec des performances allant de 74 à 92% pour la distinction de patients atteints de la MA de sujets sains par rapport à l'évaluation clinique (Dougall 2004, Read 1995).

3.2.2. Etude moléculaire

L'imagerie nucléaire a vu récemment le développement de nombreux radiotraceurs des lésions caractéristiques de la MA. La plupart de ces marqueurs sont destinés à visualiser les PA et les DNF, et la revue bibliographique présentée ci-dessous concerne essentiellement ces radiotraceurs. D'autres stratégies ont été envisagés pour l'imagerie de la MA: imagerie de la neurotransmission cholinergique (ligands de la cholinestérase, des récepteurs cholinergiques et des transporteurs de l'acétylcholine), imagerie de l'inflammation (ligands de cellules gliales activées).

3.2.2.1. Marqueurs des peptides amyloïdes

3.2.2.1.1. Traceurs utilisés en imagerie TEP

La recherche de radiotraceurs des PA en imagerie TEP est très active. De nombreuses molécules ont déjà été décrites dans la littérature, cependant quatre radiotraceurs se distinguent: le ^{11}C-PiB, le Flutemetamol, le Florbetapir et le Florbetapen dont les propriétés sont décrites dans le tableau 4.

	Pittsburg Compound B	Flutemetamol	Florbetapir	Florbetaben
Synonymes	PiB	GE-067, 3'-fluoro-PiB	AV-45	BAY-94-9172, AV-1
Groupe chimique	Benzothiazole	Benzothiazole	Styrylpyridine	Stilbène
Isotope utilisé	^{11}C	^{18}F	^{18}F	^{18}F
Affinité pour l'amyloïde (Ki, nM)	0,9	0,7	2,2	2,4
Métabolites plasmatiques	Polaire	Polaire	Polaire-apolaire	Polaire-apolaire
Dose injectée indicative (MBq)	250 – 450	185	300	300
Temps d'acquisition des images moyen (min)	40 – 90	80 – 100	50 – 70	90 – 130

Tableau 4 : Caractéristiques des marqueurs des peptides amyloïdes proposés en imagerie TEP.
D'après Herholz 2011.

Le ^{11}C-PiB ou "Pittsburg Compound B" est certainement le radiotraceur des peptides amyloïdes le plus connu à l'heure actuelle. Ce traceur se fixe de manière spécifique sur les fibres de peptides amyloïdes insolubles. Il a été montré une bonne corrélation de la répartition des plaques amyloïdes, mise en évidence *in vivo* avec ce traceur, par rapport à l'anatomo-pathologie (Ikonomovic 2008). L'estimation du temps de rétention du ^{11}C-PiB serait plus efficace que les mesures effectuées avec le ^{18}F-FDG pour distinguer les sujets sains des patients atteints de la MA (Ziolko 2006). La sensibilité du ^{11}C-PiB est jugée bonne avec 90% de correspondance avec l'anatomo-pathologie. Les sujets présentant des troubles cognitifs modérés et une forte captation de ^{11}C-PiB ont un risque élevé de développer une démence. A l'inverse, des sujets qui ne présentent pas de rétention du ^{11}C-PiB ont un risque faible de développer une démence. Le ^{11}C-PiB présente également des perspectives intéressantes pour le diagnostic différentiel de la MA avec la démence fronto-temporale (cette pathologie n'est pas associée aux agrégats de peptides amyloïdes). Malgré de nombreux avantages, le ^{11}C-PiB présente des inconvénients qui rendent son utilisation limitée en routine clinique. La mesure de la rétention du ^{11}C-PiB atteint une phase de plateau même chez des individus présentant des altérations de type Alzheimer légères, empêchant alors d'observer ce qui se passe dans les phases ultérieures (phases modérées à sévères) (Engler 2006). Le ^{11}C-PiB présente une variation inter-individuelle non négligeable qui limite son utilisation notamment pour des fins diagnostiques (Klunk 2006). Le problème vient notamment du nombre élevé de personnes âgées qui présentent une forte captation du ^{11}C-PiB alors qu'ils sont jugés non déments par l'évaluation clinique. Dans les études chez l'Homme, des captations élevées ont ainsi été retrouvées chez 10% des sujets contrôles âgés de moins de 70 ans et chez 30 à 40% des sujets

contrôles âgés de 80 ans. Les raisons de cette baisse de spécificité restent à élucider. Enfin, l'utilisation du carbone 11 comme radioisotope limite fortement l'utilisation de ce traceur du fait de sa faible disponibilité (nécessité d'un cyclotron à proximité), de sa durée de demi-vie courte (20 minutes) et de son coût important.

Afin de remédier aux inconvénients liés au carbone 11, trois nouvelles molécules marquées au Fluor 18 ont été développées: le 3'-fluoro-PiB aussi appelé Flutemetamol ou encore GE-067, le Florbetapen aussi appelé BAY-94-9172 ou encore AV-1 et le Florbetapir aussi appelé AV-45. L'utilisation du ^{18}F permet de s'affranchir des problèmes liés à l'emploi du ^{11}C. Le ^{18}F est également un produit de cyclotron, mais sa durée de demi-vie de 110 minutes permet de l'exporter et de l'utiliser à distance du lieu de production. La disponibilité plus élevée de ces traceurs rend les études d'imagerie de l'amyloïde beaucoup plus aisées et plus faciles à réaliser par un plus grand nombre d'équipes de recherche. Ces trois traceurs présentent des affinités de liaison proches de celle du ^{11}C-PiB. En revanche, le signal non spécifique localisé dans la substance blanche est deux fois supérieur à celui mesuré avec le ^{11}C-PiB. Leur cinétique de distribution est similaire à celle du PiB avec une forte entrée de traceur dans le cerveau aux temps courts et par la suite un lavage progressif de la fraction non-fixée des radiotraceurs.

Le Flutemetamol est un équivalent fluoré du ^{11}C-PiB. Il présente des propriétés de fixation des peptides Aβ insolubles très proches du composé carboné. Comme avec le ^{11}C-PiB, l'analyse de la fixation du radiotraceur concerne les cinétiques de fixation aux temps longs (phase de plateau) en prenant en compte le cervelet comme zone de référence. La sensibilité et la spécificité pour discriminer des patients atteints de la MA (n=27, âge 70±7 ans, Mini-Mental State Examination MMSE=23±2) de sujets contrôles du même âge (n=15, âge=69±8 ans, MMSE=29±1) sont toutes deux de 93% (Vandenberghe 2010). La corrélation des mesures effectuées avec le ^{11}C-PiB et ^{18}F-PiB est élevée dans les zones corticales (r=0,9). De même que pour le ^{11}C-PiB, la dégradation du traceur dans la circulation sanguine est rapide. Les produits de dégradation sont polaires et ne devraient pas pouvoir franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) et entrer en compétition avec le radiotraceur dans le cerveau. L'élimination des métabolites et de la fraction libre du radiotraceur est assurée essentiellement par la voie hépatobiliaire et dans une moindre mesure par les voies rénale et urinaire.

Le Florbetapir (ou AV-45) fait partie de la famille des styrylpyridines. La distribution de ce radiotraceur a montré une bonne corrélation avec l'immunohistochimie réalisée sur le cerveau de patients atteints de la MA. La spécificité du radiotraceur évaluée sur un échantillon de 15 patients est de 96% par rapport à l'anatomo-pathologie (Clark 2011). Comme les radiotraceurs

précédemment décrit, le Florbetapir est rapidement dégradé dans le sang. Les produits de dégradation sont capables de franchir la BHE, mais leur capacité de fixation aux peptides Aβ insolubles est jugée suffisamment faible pour ne pas altérer la qualité du signal.

Le Florbetaben (ou AV-1) fait partie de la famille des stilbènes. Il présente des propriétés très proches de celles décrites pour le Florbetapir. Le lavage de la fraction non-fixée du radiotraceur dans le tissu cérébral est plus tardif que pour le Florbetapir. La sensibilité et la spécificité mesurées entre des patients atteints de la MA (n=81 dont 59% porteurs de l'ApoE4, âge moyen 71±8 ans, MMSE=23±2) et des sujets âgés contrôles (n=69 dont 19% porteurs de l'ApoE4, âge moyen 68±7, MMSE=29±1) est de 80 et 91% respectivement (Barthel 2011). Comme pour le Florbetapir, des produits de dégradation lipophiles ont été mis en évidence et pourraient être capables de passer la barrière hématoencéphalique.

Les traceurs TEP de l'amyloïde sont nombreux et présentent des résultats très intéressants. Ils permettent de mettre en évidence la charge cérébrale en peptide amyloïde de manière rapide et avec une bonne corrélation avec le gold standard qu'est l'anatomo-pathologie. Le développement de radiotraceurs fluorés va permettre d'étendre le nombre d'études concernant l'imagerie de l'amyloïde dans la MA. Plusieurs points seront tout de même à surveiller avec les radiotraceurs décrits ci-dessus. La fixation non spécifique dans la substance blanche pourrait influer sur la qualité des images. La présence de produits de dégradation lipophiles dans le tissu cérébral pour le Florbetapir et le Florbetaben risque de diminuer le rapport signal/bruit.

3.2.2.1.2. Traceurs utilisés en imagerie TEMP

Il existe peu de traceurs TEMP développés pour l'imagerie des plaques amyloïdes dans la MA. Malgré un coût d'utilisation bien plus faible par rapport à la TEP, la TEMP souffre encore beaucoup du manque de sensibilité des appareils de détection. Le principal radiotraceur des PA développé en TEMP est le ^{123}I-IMPY.

Le IMPY ou 6-iodo-2-(4'-diméthylamino)phényl-imidazo[1,2-*a*]-pyridine est un dérivé de la thioflavine. Il fait partie de la famille des benzothiazoles et a été développé initialement afin de pallier le problème de faible pénétration des thioflavines dans le cerveau. Il s'agit d'un équivalent iodé du ^{11}C-PiB. Le ^{123}I-IMPY montre de bonnes valeurs d'affinité de liaison pour des agrégats d'Aβ40 synthétiques en solution avec un Ki de 15 nM (Kung 2002). Il pénètre dans le cerveau chez la souris dans des proportions équivalentes à celles décrites pour le ^{11}C-PiB avec 7,2% de la dose injectée par gramme de tissu deux minutes après l'injection du radiotraceur (Mathis 2003). L'incubation de ^{123}I-IMPY sur des coupes de cerveau de patients

atteints de la MA permet de mettre en évidence les dépôts amyloïdes avec une bonne corrélation avec le marquage à la thioflavine S (Kung 2004a). De la même façon, l'administration de ce composé *in vivo* dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris APPTg2576) permet la mise en évidence des plaques amyloïdes en autoradiographie sur coupes de cerveau (Kung 2004b).

3.2.2.2. Marqueurs des DNF

L'imagerie de la protéine Tau reste encore un champ relativement peu exploré. A ma connaissance, seuls deux radiotraceurs ont été décrit à ce jour: le ^{18}F-FDDNP et le ^{18}F-THK523.

Le ^{18}F-FDDNP ou 2-(1-{6-[(2-[^{18}F]fluoroéthyl)(méthyl)amino]-2-naphthyl}éthylidène) malonitrile est le principal radiotraceur connu des DNF. Il marque les DNF ainsi que les plaques amyloïdes (Shoghi-Jadid 2002). Chez l'Homme, il a montré une bonne corrélation avec la distribution des lésions neurofibrillaires mises en évidence en immuno-histochimie avec notamment une bonne distribution dans la région hippocampique, lieu d'accumulation préférentielle des DNF. Le ^{18}F-FDDNP serait plus performant que le ^{18}F-FDG pour distinguer les sujets sains des patients atteints de la MA (Small 2006). Les études menées chez l'animal sont plus contradictoires. L'imagerie TEP du ^{18}F-FDDNP n'a pas montré d'augmentation de la rétention de ce composé dans le cerveau de souris transgéniques présentant des lésions amyloïdes (Kuntner 2009). A l'inverse, une autre étude chez le rat transgénique développant des lésions amyloïdes montre une rétention plus élevée du ^{18}F-FDDNP que chez les animaux contrôles. Malgré ces perspectives intéressantes, l'avenir du FDDNP en routine clinique semble limité. En effet, d'après les expériences menées au sein du laboratoire et en collaboration avec la société Advanced Accelerator Applications qui a réalisé le radiomarquage au ^{18}F, le radiomarquage et la stabilité de ce produit sont très aléatoires (données non présentées).

Fodero-Tavoletti *et al.* ont récemment décrit un nouveau radiotraceur des fibrilles de protéines Tau: ^{18}F-THK523 (Fodero-Tavoletti 2011). Ce radiotraceur possède une affinité élevée pour les fibres de protéines Tau agrégées *in vitro* (Kd=1,67 nM). Son affinité pour les fibres amyloïdes d'Aβ42 est beaucoup plus faible (Kd= 20,7 nM) ce qui suggère une bonne spécificité de liaison pour les DNF. Un protocole de liaison du traceur sur des coupes de cerveau de souris transgéniques et de coupes issues de l'anatomo-pathologie humaine montre une bonne co-localisation du traceur avec les DNF mais pas avec les PA. L'étude de biodistribution du radiotraceur indique que ^{18}F-THK523 pénètre rapidement dans le cerveau

(2,75% de la dose injectée par gramme de tissu à 2 minutes post-injection), puis est éliminé du tissu cérébral progressivement au cours du temps. L'imagerie *in vivo* de sa distribution indique une rétention significativement plus importante dans le cerveau de souris transgéniques présentant des lésions Tau-positives mais pas de lésions Aβ-positives (modèle de souris rTg4510) par rapport à des souris contrôles. De même, la rétention du traceur 30 minutes après l'injection est plus importante chez ces mêmes souris Tau-positives par rapport à des souris APP/PS1 ne présentant que des lésions amyloïdes. L'autoradiographie des coupes de cerveau de souris rTg4510 injectées avec ^{18}F-THK523 met en évidence un radiomarquage spécifique des DNF.

Malgré tout, les résultats présentés par Fadero-Tavoletti *et al.* interpellent et en particulier concernant les cinétiques d'activité mesurées dans le sang et le cerveau. En effet, dans le sang, l'activité a tendance à augmenter au cours du temps après l'injection du radiotraceur alors que dans le cerveau, cette activité a tendance à diminuer. Cette cinétique pourrait signifier qu'il y a libération d'un composé radioactif d'un ou plusieurs tissus vers le compartiment sanguin ce qui témoignerait d'une dégradation du radiotraceur *in vivo*. L'absence de données concernant la stabilité du radiotraceur ne permet pas de discuter plus en profondeur des causes de cette augmentation d'activité dans le sang. De plus, compte tenu des cinétiques présentées, le choix de réaliser l'imagerie 30 minutes après l'injection du radiotraceur semble peu adapté. En effet, le meilleur rapport signal/bruit se trouve plutôt aux temps courts lorsque les courbes d'activité sanguine et cérébrale sont les plus éloignées.

Cependant, les résultats présentés pour l'étude du ^{18}F-THK523 sont par bien des aspects très intéressants et il faudra tenir compte des évolutions concernant ce nouveau radiotraceur des DNF.

D. Modèles animaux de la MA

1. Choix d'un modèle animal de la MA

Le choix d'un modèle animal pour l'étude de la MA reste un problème difficile. Comme de nombreux modèles animaux pathologiques, les modèles animaux de la MA ne développent qu'une partie des aspects de la pathologie. Il faut donc choisir le modèle le mieux adapté à la cible que l'on veut étudier. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte: similitudes avec les aspects moléculaires de la pathologie, similitudes avec l'évolution symptomatique de la pathologie, disponibilité des animaux, facilité d'élevage et de manipulation, coûts.

Les modèles animaux développant spontanément une pathologie proche de la MA sont très certainement les modèles les mieux adaptés pour rendre compte des évolutions anatomiques,

moléculaires et symptomatiques de la MA au cours du temps. Cependant leur utilisation reste encore très limitée du fait de la difficulté d'accès aux animaux, du temps de développement de la pathologie qui est en général relativement long, du faible nombre d'animaux développant réellement la pathologie et des difficultés liés à l'élevage de ces animaux. De plus, peu d'espèces animales développent spontanément une pathologie proche de la MA. La présence de lésions cérébrales de type amyloïde et/ou neurofibrillaire a été mise en évidence chez de nombreuses espèces d'animaux âgés: le chien, le chat, la chèvre, le mouton, l'ours, le carcajou et chez plusieurs primates comme le singe ou le *microcebus murinus* âgés (Van Dam 2010).
L'utilisation de modèles expérimentaux lésionnels ou transgéniques permet de limiter les inconvénients relatifs aux modèles animaux décrits précédemment. L'induction lésionnelle dans le cerveau de rats ou de souris permet de reproduire une partie des aspects de la pathologie de manière ponctuelle mais reste limitée pour l'étude du développement de la pathologie *in vivo*. L'injection de peptide Aβ sous différentes formes est par exemple un moyen rapide d'obtenir des agrégats de peptides Aβ dans le tissu cérébral, mais ce procédé est très éloigné de l'apparition temporelle et progressive des lésions qui a lieu chez l'Homme.
La plupart des études de la MA sur modèles animaux ont aujourd'hui recours à la technologie de la transgenèse avec la souris comme espèce de prédilection. Cette revue de la bibliographie sur les modèles animaux de la MA se concentre sur ces modèles de souris transgéniques et notamment sur le modèle de souris 3xTgAD que nous avons utilisé pour mener à bien cette étude.

2. Les souris transgéniques comme modèles de la MA

Les souris transgéniques peuvent être distinguées en trois groupes suivant le nombre de transgènes qu'elles possèdent: les souris simple, double et triple transgéniques (McGowan 2006 et Duyckaerts 2008, pour revues).

2.1. Les souris simple-transgéniques

Les souris simple-transgéniques possèdent un gène supplémentaire leur permettant de développer une ou plusieurs caractéristiques données de la pathologie. Il s'agit pour la plupart de ces modèles de reproduire les aspects moléculaires des lésions β-amyloïdes et des DNF. L'insertion du gène APP muté humain seul permet la production de peptide β-amyloïde et la formation d'agrégats amyloïdes dans le tissu cérébral (Games 1995). L'insertion du gène de l'une ou l'autre des présénilines (PS1 ou PS2) ne permet pas la production de peptides β-amyloïdes. Parmi les principaux modèles de souris simple-transgéniques pour l'étude des

lésions amyloïdes, on peut citer les souris PDAPP (Games 1995) ou tg2576 (Hsiao 1996). Les mutations du gène codant la protéine Tau induisent le développement de démences fronto-temporales chez l'Homme (Poorkaj 1998). Seuls quelques modèles de souris simple-transgéniques pour le gène Tau ont été produites et développent des lésions similaires aux DNF observées chez l'Homme (McGowan 2006, pour revue). Il est à noter qu'il existe une souche de souris, les souris rTg4510, développée afin d'étudier les effets de la suppression de l'expression du transgène Tau sur l'évolution de la pathologie (SantaCruz 2005). Ces souris possèdent un transgène composé d'un élément de réponse à la tétracycline situé en amont d'ADNc codant la protéine Tau humaine mutée (4R Tau_{P301L}). Ces souris développent des lésions de type DNF au cours du vieillissement et présentent des déficits cognitifs et une perte neuronale. L'ajout de tétracycline dans la nourriture des animaux inhibe l'expression du transgène ce qui induit un arrêt de la perte neuronal et un rétablissement des déficits cognitifs. Le nombre de DNF continue d'augmenter même en supprimant l'activité du transgène ce qui suggère que les DNF ne seraient pas responsables de la toxicité de la protéine Tau.

2.2. Les souris double-transgéniques

Les souris double-transgéniques se caractérisent par l'expression de deux gènes mutés humains. Il s'agit en général des gènes de l'APP humaine et de la β ou γ-sécrétase. La co-transfection de la PS1 mutée humaine (γ-sécrétase) avec l'APP mutée humaine permet d'augmenter le nombre de lésions et de les faire apparaître plus rapidement (Duff 1996, Borchelt 1997). Ces souris présentent de nombreux points de similitude avec la MA: la production de peptide β-amyloïde et son agrégation dans le tissu cérébral, l'altération des fonctions synaptiques, le développement de troubles du comportement (Duyckaerts 2008, pour revue). Les principaux points négatifs concernant ces modèles expérimentaux sont l'absence de pathologie neurofibrillaire, la différence de topographie des lésions amyloïdes entre la souris et l'Homme, la forte présence de peptide intracellulaire controversée chez l'Homme.

2.3. Les souris triple-transgéniques

Plusieurs solutions ont été envisagées afin de réunir les aspects de la MA liés à la protéine Tau et aux peptides amyloïdes: le croisement de souris mutantes pour la protéine Tau humaine avec des souris double-transgéniques APP/PS1, l'injection de peptides Aβ dans le cerveau de souris mutantes pour la protéine Tau humaine ou encore l'insertion directe des

gènes APP, PS1 et Tau humains mutés. Cette dernière solution est celle qui semble donner les meilleurs résultats quant à la présence de PA et de DNF.

2.3.1. Les souris 3xTgAD

En 2003, Oddo *et al.* ont décrit le premier modèle murin présentant les deux lésions typiques de la MA réunies: les souris 3xTgAD (Oddo 2003). Ce modèle animal de la MA est celui que nous avons privilégié au cours de notre étude. L'établissement de cette nouvelle lignée de souris a été réalisé en introduisant directement deux transgènes dans la lignée germinale d'une souris génétiquement modifiée. Les transgènes codant l'APP mutée humaine (APP_{swe}) et la protéine Tau mutée humaine (Tau_{P301L}) ont été micro-injectés dans des embryons unicellulaires provenant de souris homozygotes pour le gène codant pour PS1 mutée humaine ($PS1_{M146V}$). Ces souris ont préalablement subi un *knock-in* du gène $PS1_{M146V}$. Chez les souris ainsi produites, les deux transgènes sont insérés dans le même locus. Le croisement des souris hétérozygotes de la lignée F1 permet d'obtenir des animaux homozygotes pour les trois gènes. Chez ces animaux, les gènes APP et Tau sont exprimés sélectivement dans le système nerveux central (SNC), mais de façon hétérogène. Le cortex, l'hippocampe et le thalamus présentent notamment de forts taux de ces deux protéines. Au contraire les quantités d'APP et de protéines Tau sont très faibles, voire inexistantes dans le cervelet, l'hypothalamus et les bulbes olfactifs. Il a été montré que l'APP était bien clivé pour produire des peptides β-amyloïdes. La quantité d'Aβ dans le cerveau des souris 3xTgAD augmente en fonction de l'âge. Cette croissance est plus rapide et intense pour les espèces Aβ42 que Aβ40. La présence de peptide Aβ en intraneuronal est la première manifestation neuropathologique observée chez ces souris. L'immunoréactivité de l'Aβ à l'intérieur des neurones est mis en évidence à partir de 3 à 4 mois dans le néocortex et à partir de 6 mois dans le champ CA1 de l'hippocampe. Les premiers dépôts d'Aβ extracellulaires deviennent visibles à partir de l'âge de 6 mois dans le cortex frontal. A partir de 12 mois, la présence de dépôts amyloïdes est mise en évidence dans différentes régions corticales et dans l'hippocampe. Les premières manifestations neuropathologiques de la protéine Tau dans l'espace intraneuronal sont observées à partir de l'âge de 12 mois. L'immunoréactivité de la protéine Tau est dans un premier temps mise en évidence dans les neurones pyramidaux du champ CA1 de l'hippocampe. La progression des lésions Tau vers les structures corticales se fait plus tardivement. La progression des lésions dans le tissu cérébral est similaire à celle observée chez l'Homme (Oddo 2003). Les PA apparaissent dans le néocortex puis atteignent la région

hippocampique. Les DNF apparaissent dans un premier temps dans la région hippocampique puis se développent vers les aires corticales.

Les souris 3xTgAD présentent également une dysfonction synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe à partir de l'âge de 6 mois. A cet âge, les mesures effectuées en électrophysiologie sur tranches d'hippocampe montrent que la transmission synaptique basale et la potentialisation à long terme sont affectées (Oddo 2003). Ces deux mécanismes sont notamment impliqués dans les processus de mémoire. La dysfonction synaptique serait directement liée à la présence d'espèces intracellulaires d'Aβ. A cet âge et dans l'hippocampe, les souris 3xTgAD ne présentent en effet que des formes intracellulaires d'Aβ. De plus, des souris 2xTgAD $PS1_{M146V}$ /Tau_{p301L} présentant des lésions Tau-positives mais pas de lésions liées à l'Aβ, ne développent pas de dysfonction synaptique mesurable en électrophysiologie (Oddo 2003). Ces résultats sont étayés par des tests cognitifs montrant un déficit au niveau de la mémoire à long terme à partir de l'âge de 4 mois, âge auquel on observe la présence d'Aβ dans l'espace intraneuronal chez ces souris (Billings 2005).

Les descriptions anatomo-pathologiques des cerveaux de souris 3xTgAD supportent l'hypothèse de la cascade amyloïde dans la MA. En accord avec cette hypothèse, les lésions β-amyloïdes sont les premières lésions observées chez la souris 3xTgAD et pourraient initier une cascade physiopathologique similaire à celle observée dans la MA. Les lésions liées à la protéine Tau sont observées plus tardivement et seraient le résultat de l'action du peptide Aβ. Toujours en accord avec la cascade amyloïde, le peptide amyloïde serait à la base de la dysfonction synaptique observée chez ces souris. Cependant, il ne serait pas le seul acteur de la dégradation des performances cognitives chez ces souris. En effet, la diminution de la quantité d'Aβ soluble et de protéine Tau permet d'améliorer les performances cognitives alors qu'une diminution de la quantité d'Aβ soluble seule ne permet pas d'obtenir de tels résultats (Oddo 2006).

En conclusion, les lésions cérébrales retrouvées chez les souris 3xTgAD présentent de nombreux points d'homologie avec celles rencontrées chez l'Homme. Les souris 3xTgAD développent les deux types de lésions caractéristiques de la MA: les PA et les DNF. La densité et la progression topographique de ces lésions sont dépendantes de l'âge des animaux. La topographie des lésions est proche de celle rencontrée chez l'homme. Les souris 3xTgAD développent une dysfonction synaptique dans les régions concernées par les processus mnésiques. Plusieurs points relatifs à la MA n'ont pas encore été retrouvés chez ces souris. Il n'existe par exemple pas de données de la littérature concernant l'atrophie cérébrale. Malgré

tout, les nombreuses similitudes avec la pathologie humaine retrouvées chez ces animaux indiquent clairement que les souris 3xTgAD sont un bon modèle de la MA.

3. Conclusion

En conclusion, de nombreux modèles animaux de la MA existent. Les modèles obtenus par transgenèse présentent des avantages importants pour l'expérimentation par rapport aux modèles mimant la forme sporadique de la pathologie. Parmi ces modèles transgéniques, la souris triple-transgénique 3xTgAD est sans doute le modèle le plus complet sur le plan histopathologique. Les souris 3xTgAD ont notamment l'avantage de développer les deux types de lésions cérébrales caractéristiques de la MA: les PA et les DNF.

E. Problématique de recherche et projet mis en place

La MA est une pathologie caractérisée par un syndrome démentiel évoluant progressivement vers une perte totale d'autonomie. Il s'agit par définition d'une maladie dynamique. Cet aspect, bien décrit sur le plan psycho-comportemental, reste encore mal compris sur le plan moléculaire. Jusqu'à présent, les observations moléculaires ou cellulaires étaient réalisées lors d'analyses *post-mortem* qui reflètent seulement un moment particulier et figé de la maladie. Il est aujourd'hui nécessaire de développer de nouveaux moyens pour suivre l'évolution des caractéristiques physiopathologiques de la MA au cours du temps. L'imagerie nucléaire permet de suivre *in vivo* une cible spécifique d'un processus physiologique particulier. Cette technique est donc tout à fait adaptée à l'étude des modifications moléculaires et/ou cellulaires qui ont lieu au cours du développement de la MA.

La mise au point de radiotraceurs spécifiques de la MA permettra de réaliser des études longitudinales et donc de mieux caractériser la pathologie dans le temps. Le développement de l'imagerie nucléaire de la MA peut apporter des bénéfices indéniables dans plusieurs champs d'application tels que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'amélioration du diagnostic, ainsi que l'amélioration des connaissances fondamentales concernant les mécanismes qui encourent pendant cette pathologie. Sur le plan thérapeutiques, l'émergence de nouveaux médicaments pour le traitement de la MA est fortement limiter par l'absence de technique efficace permettant de suivre les effets du médicament sur sa cible. L'imagerie nucléaire permettra de mesurer l'impact du médicament sur sa cible *in vivo* et ainsi de mieux évaluer l'efficacité de ces traitements sur les patients. Sur le plan diagnostic, les examens cliniques psycho-comportementaux réalisés par des spécialistes permettent de faire un diagnostic fiable dans la plupart des cas. Cependant, le

développement de nouvelles techniques d'imagerie permettrait de soutenir le diagnostic clinique dans plusieurs domaines: une mesure standardisée de l'état du patient limiterait les différences de performance diagnostique entre les centres hospitaliers, le diagnostic différentiel qui reste l'un des principaux problèmes sur le plan diagnostic pourrait être nettement amélioré par une évaluation de la quantité et de la répartition de lésions cérébrales caractéristiques, enfin l'appréciation de la rapidité d'évolution de la maladie pour chaque patient est difficile à réaliser en clinique et l'imagerie nucléaire pourrait apporter une mesure fine de cette cinétique de manière individualisée. Enfin sur le plan fondamental, la mise au point de radiotraceurs spécifiques de différents aspects moléculaires de la MA doit permettre de mieux appréhender les relations spatiotemporelles entre ces lésions et donc de mieux comprendre les causes de cette pathologie.

Dans ce contexte, notre objectif est de mettre en place une stratégie de développement de nouvelles molécules permettant l'identification et le suivi des marqueurs moléculaires de la maladie d'Alzheimer, en particulier des marqueurs des plaques amyloïdes et des formes pathologiques de la protéine Tau.

Dans un premier temps, nous avons mis en place et caractérisé un modèle animal de cette pathologie : les souris triple-transgéniques 3xTgAD (Oddo 2003). Ces animaux développent les deux principales lésions caractéristiques de la MA, les lésions de type amyloïde et les lésions de type neurofibrillaire, ce qui en fait un modèle animal particulièrement intéressant pour notre projet.

Par la suite, différents marqueurs pré-existants ont été évalués chez ces souris, des marqueurs métaboliques (^{99m}Tc-HMPAO et ^{18}F-FDG) et un marqueur des plaques (^{125}I-IMPY) afin de mieux caractériser ce modèle et de préciser les limites de son utilisation potentielle pour l'imagerie *in vivo*.

Enfin, nous avons initié le développement de nouveaux traceurs des lésions caractéristiques de la MA. En ce qui concerne les plaques amyloïdes, deux familles de molécules ont été évaluées : les para-sulfonato-calix[4]arènes (ou calixarènes) et des dérivés de proflavines: les COB. Les calixarènes sont des molécules d'intérêt en tant que vecteur de molécules à vocation thérapeutique ou d'imagerie grâce à leur cavité hydrophobe pouvant accueillir des molécules organiques neutres ou chargées. Ils ont également la capacité de fixer les feuillets β-croisés, motifs que l'on retrouve notamment dans les agrégats de peptides β-amyloïdes (Cecillon 2007). Les COB sont des composés aromatiques de type aminoacridine, qui ont la propriété d'interférer avec les fibres amyloïdes *in vitro*.

En ce qui concerne les DNF, notre choix s'est porté sur une séquence peptidique soupçonnée de se fixer sur les protéines Tau en paires de filaments hélicoïdaux. Face à la faible pénétration de ce peptide dans le cerveau, nous avons développé un vecteur capable de transporter ce type de séquence vers sa cible dans le tissu cérébral.

Travail expérimental

Partie I: Validation d'un modèle animal de la MA

Afin de mener à bien ce projet, nous avons dans un premier temps mis en place un élevage d'animaux qui sont un bon modèle de la MA. Il s'agit des souris transgéniques 3xTgAD qui possèdent trois gènes mutés humains et qui développent les deux lésions histopathologiques caractéristiques de la maladie. La mise en place de ce nouvel outil nous a conduit à évaluer les caractéristiques de ces souris dans nos conditions d'élevage. Nous avons ainsi vérifié la présence des trois gènes mutés chez toutes les souris ayant été utilisées pour les expériences d'intérêt et nous avons évalué le profil de distribution des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires au cours du vieillissement afin de sélectionner des animaux d'âge adapté à l'étude.

A. Matériels et méthodes

1. Conditions d'élevage et d'expérimentation

Les souris sont élevées dans des enceintes protégées dans une animalerie standard. L'euthanasie des animaux est réalisée par inhalation de gaz carbonique. Les expériences sont effectuées dans des conditions d'hébergement et d'expérimentation respectant les règles d'éthique expérimentale chez l'animal (European Ethics Commitee on Animal Care Guideline Directive n°86/609/EEC).

2. Immunohistochimie Aβ et Tau

Afin de pouvoir réaliser un marquage immunohistochimique de qualité, le cerveau des animaux doit être fixé par injection *in vivo* de fixateur. Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution d'un mélange de kétamine (50 mg/kg) / xylasine (10 mg/kg) en rapport 2/3 et 1/3 à raison de 1 ml/kg. Une solution de PBS 0,1M (Phosphate Buffer Saline 1x) est injectée à l'aide d'une pompe dans le ventricule gauche du cœur à un débit de 4 ml/minute pendant 10 minutes. Le ventricule droit est incisé à la base pour éliminer l'excès de volume sanguin. Après 10 minutes de perfusion, le sang s'écoulant du ventricule droit est clair, une solution de paraformaldhéhyde (PAF) à 4% est alors injectée à la suite du PBS au même débit. Après avoir passé environ 40 ml de fixateur, le cerveau est prélevé avec

précaution et immergé dans une solution de PAF 4% pendant une heure afin d'améliorer la fixation, puis dans une solution de PBS 1x / sucrose 10% pour la nuit afin d'assurer la cryoprotection. La solution de sucrose est une solution hypertonique qui rend les cellules plus résistantes lors de la cryosection. Le lendemain, des coupes transversales de 20 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryotome à -18°C. Les coupes sont immédiatement immergées dans une solution de PBS.

Pour chaque anticorps utilisé, quinze à vingt coupes transversales représentatives des différentes parties du cerveau sur l'axe fronto-caudal sont placées dans 5 ml de PBS. L'expérience est réalisée dans des boites de culture cellulaire de 12 puits, le volume d'un puit étant d'environ 5 ml. Dans un premier temps, un blocage des peroxydases endogènes est effectué à l'aide d'une solution de peroxyde d'hydrogène afin d'éliminer toute réaction endogène pouvant provenir d'une altération de la BHE chez l'animal ou d'une mauvaise fixation du cerveau. Les coupes sont ainsi incubées pendant 15 à 20 minutes dans une solution contenant 4 µl d'H_2O_2 à 30% pour 5 ml de PBS 1x (H_20_2 à 30%, Sigma). La solution de blocage est éliminée puis les coupes sont lavées (PBS 1x; 3x5min). Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire: Aβ4G8 pour le marquage du peptide Aβ et AT8 pour le marquage des dégénérescences neurofibrillaires. L'Aβ4G8 et l'AT8 sont dilués au 1/1500 et 1/500 respectivement dans une solution de PBS 1x / triton 0,3%. L'incubation avec l'anticorps est réalisée dans 1,5 ml pendant la nuit à 4°C dans une atmosphère humide afin que le volume de liquide ne soit pas affecté. Après lavage (PBS 1x, 3x5min), les coupes sont mises à incuber pendant 90 minutes à température ambiante dans 1,5 ml de solution contenant l'anticorps secondaire biotinylé (Horse anti-mouse ou goat anti-mouse, VectorLabs) dilué au 1/100 dans du PBS 1x/triton 0,3%. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS 1x. Afin d'amplifier le nombre de sites de réaction enzymatique, une solution contenant des complexes d'avidine et de biotine est appliquée sur les coupes. Les coupes sont ainsi incubées pendant 90 minutes à température ambiante dans 1,5 ml de PBS1x / triton 0,3% / avidine 1% / Biotine 1% (Vectatstain ABC systems, PK4000, peroxydase standard, VectorLabs) préparé 30 minutes avant utilisation. Les coupes sont lavées dans du PBS 1x (1x5min) puis dans du tampon phosphate (PB) 0,1M (2x5min). La réaction enzymatique est réalisée grâce à un substrat coloré de la peroxydase: la DAB qui passe d'une couleur rose à une couleur brune après réaction. La DAB étant toxique, elle nécessite d'être manipulée avec précaution surtout sous forme de poudre. La solution de DAB est préparée au maximum 10 minutes avant son utilisation à une concentration de 0,5 mg/mL dans du PB 0,1M (la DAB est d'abord mélangée dans un volume d'eau avant d'ajouter une quantité équivalente de PB 0,2M afin d'éviter un

précipité). Les coupes sont incubées dans 5 mL de solution de DAB pendant 5 minutes, puis la solution d'H_2O_2 est ajoutée afin d'initier la réaction enzymatique (2 µl pour 5 ml). Suivant l'intensité de la coloration désirée, la réaction est stoppée 3 à 9 minutes après l'ajout d'H_2O_2 en éliminant rapidement la solution de DAB/H_2O_2 (mettre de l'eau de javel dans la fiole de récupération du système d'aspiration permet de neutraliser la DAB) et en rinçant les coupes avec du PB 0,1M (2x5min). Les coupes sont brièvement rincées dans l'eau distillée avant d'être montées sur lames gélatinées. Après séchage complet, une contre-coloration au crésyl violet est réalisée. Les coupes sont d'abord réhydratées dans un bain d'eau distillée (1x5min) puis colorées dans un bain de crésyl violet à 1 g/l (1x5min) et rapidement rincées à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite déshydratées par bains successifs d'éthanol (70%, 2x5min; 95%, 2x5min; 100%, 2x5min) et de xylène (2x5min). Les lames sont montées avec une lamelle à l'aide d'un liquide de montage en phase organique.

3. Génotypage

Afin de vérifier la stabilité de la lignée de souris au cours de l'élevage et que les souris n'ont pas perdu de transgènes au cours du temps, nous avons procédé à un génotypage des souris 3xTgAD pour les transgènes PS1, APP et Tau. Quelques semaines après leur naissance, quelques gouttes de sang sont prélevées à chaque souris en pratiquant une incision du bout la queue. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés et rapidement congelé à -20°C. L'ADN est extrait et purifié à partir de ces échantillons selon les instructions de la trousse Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE healthcare). Une amplification en chaîne par polymérase (PCR pour Polymerase Chain Reaction) des ADN génomiques est réalisée afin d'amplifier le nombre de copies des gènes d'intérêt. La PCR est réalisée grâce à la trousse GoTaq DNA polymerase (Promega, Wisconsin, USA) contenant l'enzyme polymérase et les oligonucléotides nécessaires à la réaction. Les amorces utilisées sont fournies par Microsynth (Balgach, Suisse). Les conditions de PCR pour chaque transgène sont décrites dans le tableau 5.

Pour le génotypage des transgènes Tau et APP, les transgènes sont intégrés dans le même locus. Si la présence de l'un des deux transgènes est mise en évidence, l'autre est obligatoirement présent. La PCR a donc été réalisée uniquement pour le gène APP.

Pour le génotypage du gène PS1, l'amorce utilisée amplifie également le gène endogène de la souris. Il est donc nécessaire d'utiliser une endonucléase de restriction sur les produits de PCR avant migration sur gel afin de différencier le gène endogène du transgène. Cette enzyme clive la séquence du transgène en 2 parties s'il est présent mais n'affecte pas le gène endogène.

L'enzyme utilisée, BstE II (Sigma-Aldricht, Saint-Louis, Missouri, USA) reconnaît la séquence 5'G/GTNACC'3.

Les produits de PCR sont mis à migrer sur gel d'agarose 2% contenant du bromide d'éthidium (E-Gel 2% General purpose Agarose 18-pak, Invitrogen, Paisley, Royaume Uni) afin de vérifier la présence ou l'absence du transgène recherché chez l'animal. Pour le gène PS1, si la souris ne possède pas le transgène on voit apparaître une seule bande à 550 paires de bases (pdb) sur le gel correspondant au gène endogène. Si la souris est hétérozygote, on voit apparaître 3 bandes à 550, 300 et 250 pdb. Il s'agit alors du gène endogène et des 2 parties du transgène. Enfin, si elle est homozygote pour le transgène, on voit apparaître 2 bandes à 300 et 250 pdb qui correspondent aux deux parties du transgène. Pour le gène APP ou Tau, une seule bande est observée en présence du transgène ou aucune bande en son absence.

	PS1	APP	Tau
Séquence de l'amorce utilisée	5' - cacacgcaactctgacatgcacaggc - 3' 5' - aggcaggaagatcacgtgttcaagtac - 3'	5' - gcttgcaccagttctggatgg - 3' 5' -gaggtattcagtcatgtgct - 3'	5' -gaggtattcagtcatgtgct - 3' 5' -ttcaaagttcacctgatagt - 3'
Cycles de PCR utilisés	94 C X 2.5' **94 C X 40''** **62 C X 40''** **72 C X 1'** 72 C X 3' Les étapes indiquées en gras sont à répéter 35 fois	94 C X 5' **94 C X 30''** **53 C X 30''** **72 C X 1'** 72 C X 3' Les étapes indiquées en gras sont à répéter 20 fois	94 C X 5' **94 C X 30''** **52 C X 30''** **72 C X 1'** 72 C X 3' Les étapes indiquées en gras sont à répéter 25 fois

Tableau 5 : Conditions de PCR pour le génotypage des souris 3xTgAD pour les gènes PS1, APP et Tau.

B. Résultats

1. Génotypage

La vérification de la présence des transgènes chez les souris transgéniques est réalisée grâce à une migration des ADN d'intérêt sur un gel après avoir été amplifiés grâce à une PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Un exemple de ces gels est mis en évidence sur la figure 18.

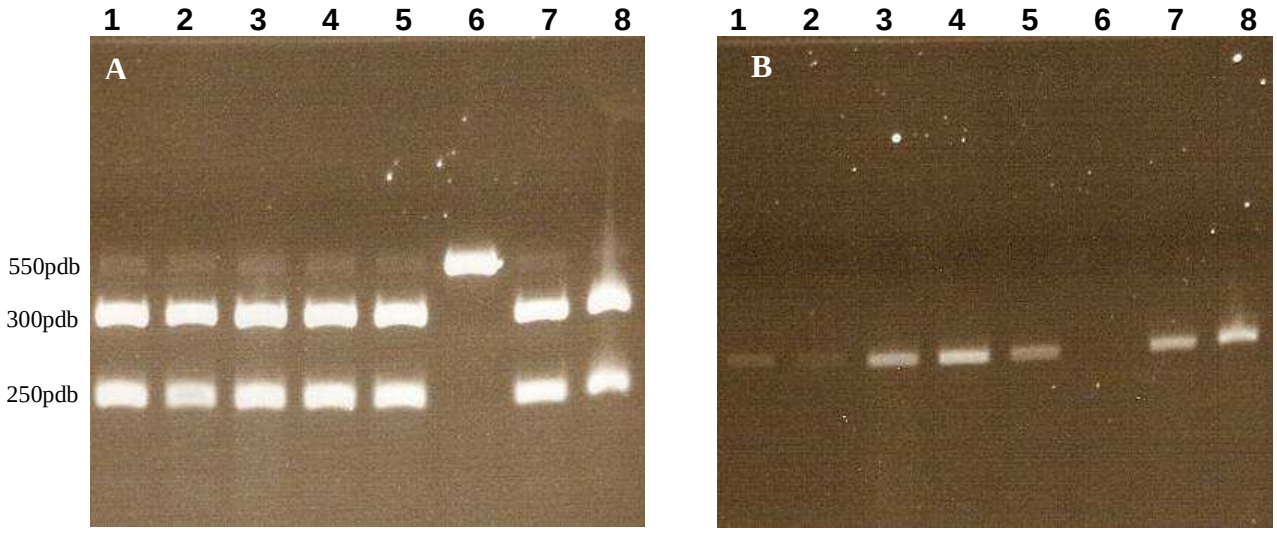


Figure 18: Analyse du génotypage des souris pour les gènes PS1 et APP

A: Exemple de gel obtenu pour le génotypage du gène PS1 muté humain. La présence de 2 bandes à 250 et 300 paires de bases (pdb) indique que les souris sont homozygotes pour PS1. La présence d'une seule bande à 550 pdb indique que les souris ne possèdent pas le transgène ; B: Exemple de gel obtenu pour le génotypage du gène APP muté humain. La présence d'une bande révèle la présence du transgène chez la souris. L'absence de bande révèle l'absence du transgène. Sur les deux exemples de gels présentés, les bandes de 1 à 5 et 7, 8 correspondent à des souris 3xTgAD. La bande numéro 6 correspond à un échantillon provenant d'une souris contrôle.

Pour le gène PS1, les gels de contrôle mettent en évidence 2 bandes à 250 et 300 paires de bases pour tous les animaux 3xTgAD de l'élevage. Les souris 3xTgAD utilisées lors des expérimentations sont donc bien homozygotes pour le gène PS1 muté humain. Le génotypage des souris sauvages (WT pour Wild Type) met en évidence la présence d'une seule bande à 550 pdb. Comme attendu, les souris WT ne possèdent pas le gène PS1 muté (puit numéro 6 – Figure 18-A).

Pour les gènes APP et Tau, les deux transgènes étant insérés sur le même locus, la mise en évidence de la présence de l'un des deux permet de conclure à la présence de l'autre transgène. Nous avons décidé de réaliser le génotypage des animaux pour le gène APP. Les gels de contrôle mettent en évidence la présence d'une seule bande pour toutes les souris 3xTgAD de l'élevage. Les souris 3xTgAD de notre élevage sont donc effectivement porteuses des gènes APP et Tau mutés humains. Les souris contrôles ne possèdent pas ces deux gènes comme l'indique l'absence de bande sur les gels de migration (Echantillon numéro 6 – Figure 18-B).

2. Histologie des dépôts d'Aβ et des protéines Tau hyperphosphorylées

Afin de s'assurer que les animaux issus de notre élevage développaient bien des lésions de type amyloïdes et neurofibrillaires, nous avons effectué un marquage immunohistochimique des PA et des DNF sur des coupes de cerveau de souris 3xTgAD. Des exemples de marquage en immunohistochimie sont présentés sur les figures 19, 20 et 21.

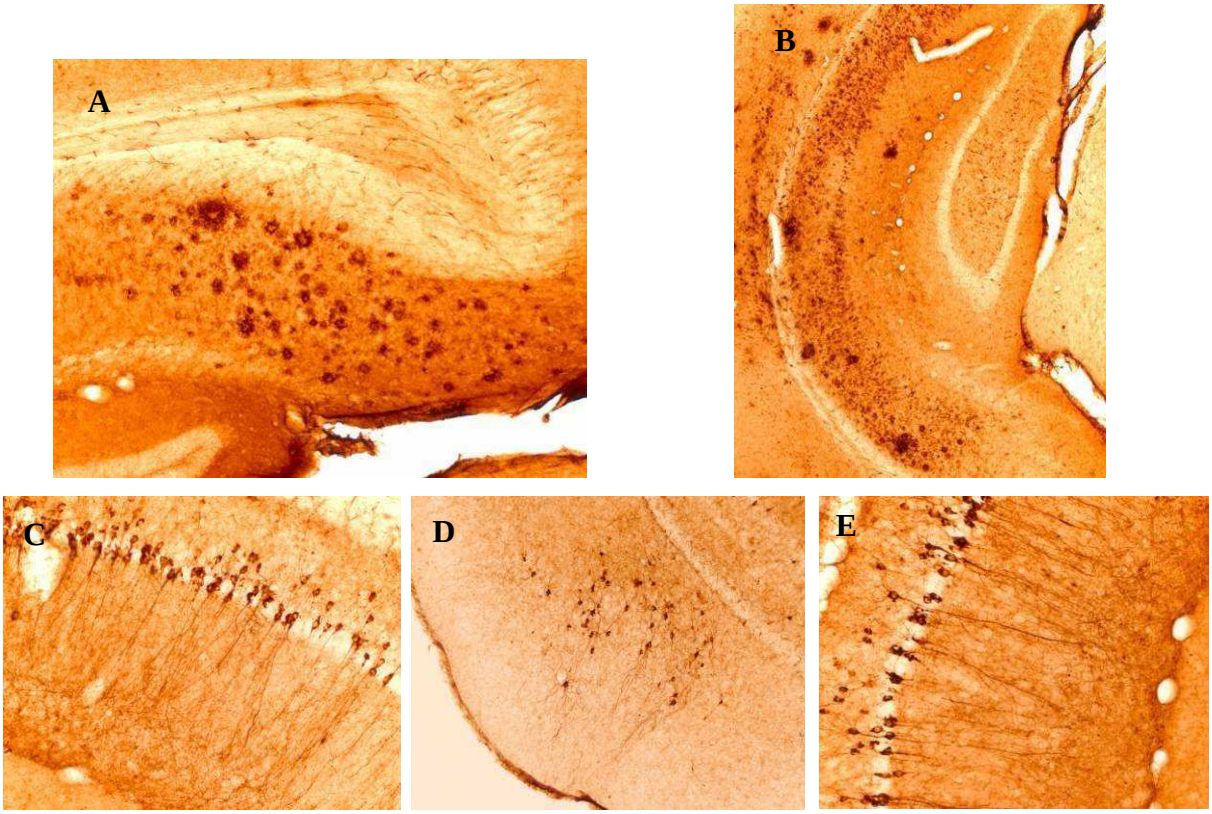


Figure 19: Topographie des lésions amyloïdes et des lésions neurofibrillaires

L'immunomarquage des dépôts amyloïdes (A et B) et des lésions neurofibrillaires (C, D et E) est réalisé sur des coupes de cerveau de souris 3xTgAD femelles âgées de 17 mois (anticorps Aβ4G8 et AT8 respectivement). La majorité des lésions se trouvent dans l'hippocampe dorsal (A et C), latéral (B et E) et dans l'amygdale (D).

La topographie des lésions est identique chez tous les animaux de même âge. L'hippocampe est le siège de la plupart des lésions. On retrouve de nombreux dépôts amyloïdes diffus et des dépôts plus denses dans l'hippocampe (Figure 19 A et B). L'hippocampe dorsal et ventral est fortement affecté par la pathologie amyloïde. L'amygdale présente également une forte densité de PA. La protéine Tau hyperphosphorylée est mise en évidence en quantité importante dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones de l'hippocampe. La distribution des lésions neurofibrillaires est similaire à celles des PA avec une forte densité dans l'hippocampe dorsal, ventral et dans l'amygdale (Figure 19 C, D et E). Les souris WT ne présentent pas de dépôts amyloïdes, ni de DNF visibles après immuno-marquage.

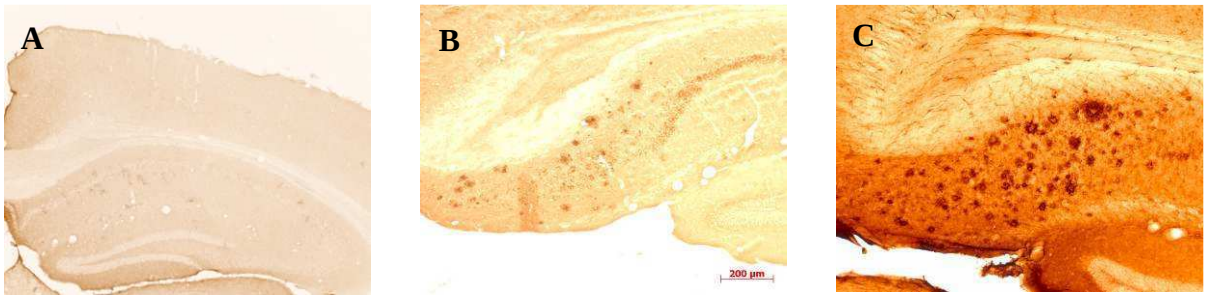


Figure 20: Evolution temporelle des lésions amyloïdes chez la souris 3xTgAD

L'immunomarquage est réalisé chez des souris 3xTgAD femelles âgées de 6, 14 et 17 mois (A, B et C respectivement). Les clichés sont réalisés dans l'hippocampe dorsal. Les dépôts amyloïdes commencent à apparaître à partir de l'âge de 14 mois (B) et leur nombre augmente fortement avec l'âge des animaux (C).

Comme en ce qui concerne la topographie des lésions, leur évolution temporelle est reproductible entre tous les animaux évalués. Les deux lésions caractéristiques de la MA apparaissent et se développent au cours du vieillissement des animaux 3xTgAD. A 6 mois, les PA et les DNF sont absents (Figure 20-A). A 14 mois, les dépôts extracellulaires et l'accumulation de protéine Tau intracellulaire sont clairement visibles en immunohistochimie (Figure 20-B). A 17 mois, l'hippocampe présente de très nombreux dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes ainsi que de nombreuses cellules Tau-positives (Figure 20-C). La région corticale est également touchée mais dans une moindre mesure et plus tardivement.

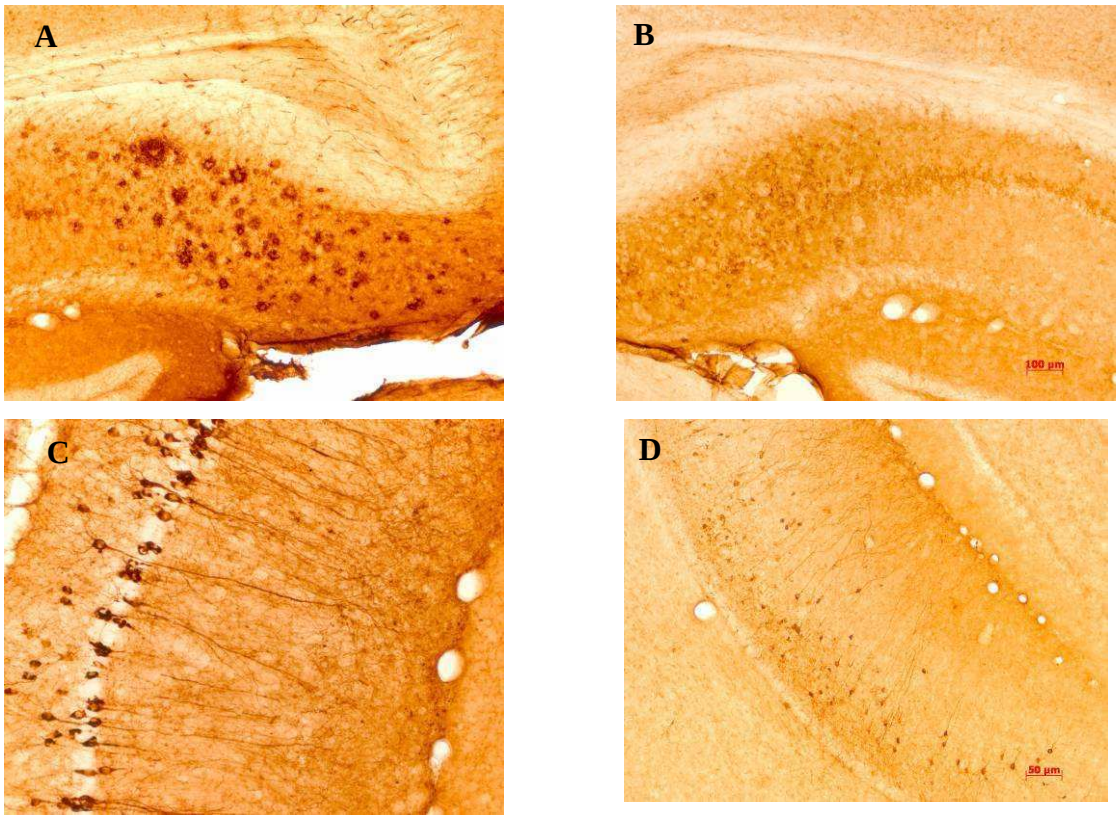


Figure 21: Comparaison du nombre de lésions entre souris 3xTgAD mâles et femelles

Mise en évidence des dépôts amyloïdes (A et B) et des lésions neurofibrillaires (C et D) chez des souris 3xTgAD femelles (A et C) et mâles (B et D) âgées de 17 mois. Au même âge, les femelles présentent plus de lésions que les mâles.

Les lésions amyloïdes et neurofibrillaires sont plus nombreuses chez les femelles que chez les mâles au même âge (Figure 21). En conséquence, les souris femelles ont été privilégiées par rapport aux souris mâles pour les études des radioligands des PA.

C. Discussion

La maladie d'Alzheimer est une pathologie caractérisée par la présence de deux types de lésions cérébrales typiques: les plaques amyloïdes (PA) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Notre objectif est de développer des radiotraceurs spécifiques de ces deux lésions. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris transgéniques reproduisant ces deux aspects de la pathologie: les souris 3xTgAD. Ces animaux sont porteurs de 3 transgènes codants des protéines mutées humaines: la préséniline-1 ($PS1_{M146V}$), le précurseur de la protéine β-amyloïde (APP_{swe}) et la protéine Tau (Tau_{P301L}). Afin de disposer de suffisamment d'animaux pour mener ce travail, nous avons mis en place un élevage de ces souris au sein du laboratoire. Un génotypage systématique des souris issues de cet élevage

nous a permis de nous assurer que toutes les souris utilisées dans cette étude étaient bien porteuses des trois transgènes. Parallèlement, la présence de PA et de DNF dans le tissu cérébral des animaux 3xTgAD a été évaluée. L'immunohistochimie et le marquage fluorescent avec la thioflavine nous ont permis d'évaluer comment les deux lésions se développent chez ces animaux. L'évolution temporelle des lésions est proche de celle décrite dans la littérature (Oddo 2003). A 6 mois, aucune des deux lésions n'a pu être mise en évidence. La présence de PA dans le milieu extracellulaire et de DNF dans les corps cellulaires des neurones est observée à partir de 14 mois dans l'hippocampe et le cortex frontal. Leur nombre et leur densité augmentent fortement au cours du temps. A 17 mois, de nombreuses lésions sont visibles dans ces mêmes régions. La distribution des PA est différente de celle mise en évidence chez l'homme. En effet, chez l'Homme, les PA se développent dans un premier temps dans les parties basales des cortex frontal, temporal et occipital. La région hippocampique est affectée tardivement. Chez les souris 3xTgAD, les PA apparaissent d'abord dans la région hippocampique. En revanche, la distribution des DNF est assez similaire à celle observée chez l'homme avec une évolution topographique allant de la région hippocampique dans un premier temps vers les régions corticales dans les phases tardives. Chez les souris 3xTgAD, les animaux femelles présentent des lésions en plus grande quantité que les animaux mâles. Les femelles ont donc été privilégiées pour les études d'imagerie. Un élevage de souris de même souche que les souris 3xTgAD a été mis en place afin de disposer d'animaux contrôles. Ces souris de type sauvage (WT pour Wild-type) ne développent aucun des deux types de lésions recherchées. Dans la mesure du possible, lors de cette étude, nous avons utilisé des souris WT de même âge en tant que contrôle. Le choix d'un modèle murin transgénique de la MA a été motivé par plusieurs facteurs. L'élevage de ces animaux est relativement aisé, moins contraignant et moins coûteux par rapport à des modèles animaux développant spontanément la pathologie comme les primates qui demandent un investissement important. Les souris transgéniques présentent également l'avantage de développer les lésions de façon reproductible contrairement aux modèles animaux tels que le microcèbe chez qui seulement environ 20% des animaux développent aléatoirement la pathologie (Bons 2006). Ces différents avantages et les études de caractérisation de ces animaux en immunohistochimie nous confirment que les souris 3xTgAD sont un modèle animal de la MA adapté au développement de nouveaux radiotraceurs des PA et des DNF.

D. Conclusion

Les souris 3xTgAD issues de notre élevage présentent toutes les trois gènes mutés humains: PS1, APP et Tau. Sur le plan histopathologique, les souris 3xTgAD développent des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires au cours du vieillissement notamment dans l'hippocampe qui est le siège des phénomènes de mémorisation. On trouve ces lésions à partir de l'âge de 14 mois chez tous les animaux et en quantité généralement plus importante chez les individus femelles que chez les mâles. Ce modèle animal de la MA est adapté au développement de nouveaux radiotraceurs des lésions amyloïdes et neurofibrillaires.

Partie II: Evaluation de radiotraceurs existants

Après avoir validé le modèle animal, nous avons souhaité évaluer le comportement biologique de différents radiotraceurs décrits dans la littérature sur ce modèle. Nous avons sélectionné trois radiotraceurs en raison de l'intérêt potentiel qu'ils représentent pour le suivi de la MA. Le ^{99m}Tc-HMPAO s'accumule dans les neurones proportionnellement au débit sanguin cérébral et permet ainsi d'évaluer la perfusion sanguine cérébrale. Le ^{18}F-FDG est un analogue du glucose et permet donc d'évaluer la consommation cérébrale de glucose. Ces deux radiotraceurs sont facilement disponibles et présentent des résultats intéressants pour la distinction de personnes atteintes de la MA et de personnes saines en ce qui concerne les aspects métaboliques et fonctionnels de la pathologie (Vlasenko 1997 et Mosconi 2005). Le troisième radiotraceur étudié est le ^{125}I-IMPY. Il s'agit de l'équivalent du ^{11}C-PiB qui est, à l'heure actuelle, le radiotraceur principal utilisé pour la détection *in vivo* de la charge amyloïde dans le cerveau (Mathis 2003). La liste des protocoles expérimentaux effectués pour l'évaluation de ces trois radiotraceurs est décrite dans le tableau 6.

Radiotraceur évalué	Fonction ou cible étudiée	Imagerie planaire	Imagerie tomographique	Biodistribution	Autoradiographie *ex vivo*
^{99m}Tc-HMPAO	Débit sanguin cérébral		x		x
^{18}F-FDG	Métabolisme du glucose		x		x
^{125}I-IMPY	Plaques amyloïdes	x		x	x

Tableau 6 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque radiotraceur étudié

I. Evaluation biologique du ^{99m}Tc-HMPAO

Le ^{99m}Tc-HMPAO est un radiotraceur du débit sanguin cérébral. Utilisé chez l'homme pour évaluer les défauts de perfusion cérébrale des patients atteints de la MA, nous avons évalué ses propriétés sur le modèle de souris 3xTgAD en imagerie tomographique *in vivo* et en autoradiographie sur coupes de cerveau de souris.

A. Matériels et méthodes

1. Radiochimie

La trousse Ceretec® contient un lyophilisat stérile et apyrogène comprenant 0,5 mg d'hexamétazime (hexa méthyle propylène amine oxime), 7,5 µg de chlorure stanneux di-hydraté (réducteur) et du chlorure de sodium (tampon) sous atmosphère d'azote. Ce lyophylisat est dissout par addition de 1 ml (1000 MBq) d'une solution de pertechnétate de sodium fraîchement éluée. Le mélange est ensuite incubé pendant 5min à température ambiante. L'HMPAO forme un complexe neutre et lipophile avec le ^{99m}Tc en présence d'étain (log P = 1,9).

Le marquage aboutit à la formation d'un complexe lipophile qui se transforme assez rapidement en un complexe secondaire de nature hydrophile, ce qui limite la durée de vie du composé à 30 minutes. L'addition de chlorure de cobalt permet de stabiliser le composé et de disposer d'une durée de vie augmentée à 6 heures.

La préparation de Ceretec® nécessite un contrôle de la pureté radiochimique avant son utilisation et doit être utilisée rapidement. Le contrôle de qualité est réalisé par chromatographie sur couche mince ou CCM (ITLC™ SG) et le solvant de migration utilisé est soit du NaCl, soit de l'acétate d'éthyle. Dans le NaCl, le TcO_4^- qui n'a pas réagit migre au front de solvant et le HMPAO technétié reste au dépôt de migration. Dans l'acétate d'éthyle, l'HMPAO technétié et TcO_4^- migrent et les colloïdes restent au point de dépôt de migration.

2. Imagerie *in vivo*

2.1. Administration des radiotraceurs et anesthésie des animaux

Les radiotraceurs sont injectés dans l'une des veines latérales de la queue. Les animaux sont anesthésiés pour la durée de l'imagerie par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (50 mg/kg) / xylasine (10 mg/kg) en rapport 2/3 et 1/3 à raison de 1 ml/kg.

2.2. Protocole expérimental *in vivo* du ^{99m}Tc-HMPAO

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement du ^{99m}Tc-HMPAO *in vivo* chez la souris 3xTgAD est présenté sur la figure 22.

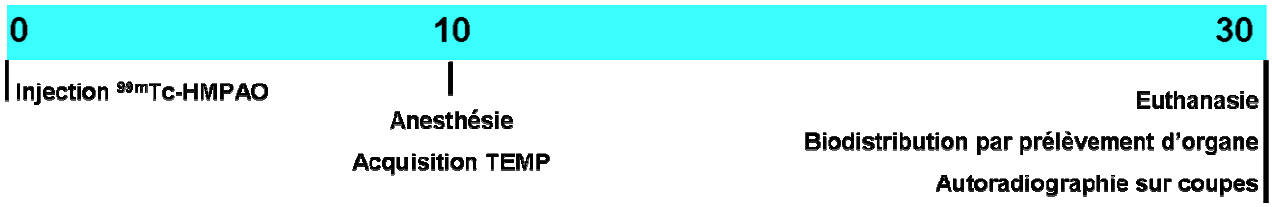


Figure 22: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{99m}Tc-HMPAO

L'échelle de temps est exprimée en minutes.

2.3. Acquisition des images

Le suivi du composé radioactif ^{99m}Tc-HMPAO est réalisé par détection externe de la radioactivité grâce à une γ-caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures, Paris, France). Les acquisitions scintigraphiques sont réalisées en mode tomographique à l'aide du logiciel γ-Acquisition (Biospace Lab). L'imagerie tomographique a été réalisée en utilisant les deux "têtes" de la caméra équipées de collimateurs de type pinhole. Ces collimateurs n'étant pas sélectif envers un isotope donné, la séparation en énergie est réalisée par le logiciel ce qui permet de sélectionner uniquement les événements propres au technétium 99m.

2.4. Analyse des images TEMP et quantification

Pour l'évaluation du ^{99m}Tc-HMPAO, la reconstruction des images tomographiques est assurée par le logiciel γ-acquisition en utilisant un algorithme de reconstruction "ordered-subsets-expectation-maximization". L'analyse des images tomographiques s'effectue avec le logiciel Amira. Des coupes transversales ciblées sur le cerveau de l'animal sont extraites du volume reconstitué. La quantification de ces coupes s'effectue à l'aide du logiciel γ-vision+ (BioSpace Lab). Une région d'intérêt (ROI pour Region Of Interest) est tracée sur le cerveau dans son ensemble. La quantité de radioélément est exprimée en coups par minute par unité de surface (cpm/mm²). Les valeurs obtenues sont corrigées de la décroissance radioactive du radiotraceur étudié par rapport à l'heure d'injection ($T_{1/2}$ = 6,02 heures pour le ^{99m}Tc).

3. Analyses *post-mortem*

3.1. Préparation des coupes de cerveau de souris

Après euthanasie, le cerveau est délicatement prélevé et immédiatement immergé dans une solution de 2-MéthylButane à -20°C pendant 5 minutes. Le cerveau est placé dans un cryotome (Microm HM 505, Francheville, France) réglé à -18°C pendant 15 minutes avant de réaliser les coupes afin que le tissu s'équilibre en température. Des coupes de 20 µm d'épaisseur sont réalisées dans le plan transverse à différents niveaux du cerveau: au niveau du cortex frontal, du striatum, de l'hippocampe en position dorsale ou latérale, et du cervelet. Les coupes sériées sont placées sur des lames d'histologie "pré-coatées" (Polysine Slides, Thermo scientific) afin d'obtenir des séries de lames appariées. Ainsi chaque série comporte six coupes réalisées au niveau de l'hippocampe et deux coupes au niveau du cortex frontal, du striatum et du cervelet. Après dépôt des coupes sur les lames, les lames sont placées 5 minutes sur une plaque chauffante à 40°C afin de sécher et d'assurer l'adhérence du tissu sur le support. Les lames sont ensuite stockées dans une boite hermétique à -80°C.

3.2. Autoradiographie et analyse des images

Les coupes sont placées au contact d'un film radiosensible permettant de détecter la quantité de radioactivité contenue dans chaque coupe. Les films radiosensibles sont révélés à l'aide d'un phospho-imager (Fujifilm BAS 5000). Les images autoradiographiques obtenues sont quantifiées à l'aide du logiciel associé au phospho-imager utilisé (Image-Gauge, Fuji). Des zones d'intérêt sont tracées manuellement et l'activité en radiotraceur, exprimée en intensité d'excitation des cellules du film par unité de surface ("Phospho-Stimulated Luminescence" ou PSL/mm²), est déterminée. L'activité est ensuite normalisée à la dose injectée (DI) pour obtenir des PSL/mm²/DI. Afin de comparer les radiotraceurs entre eux, l'activité des zones d'intérêt est ensuite exprimée en pourcentage de l'activité dans le cervelet, ce dernier nous servant de contrôle puisqu'il n'est pas affecté par les lésions typiques de la MA.

B. Résultats

1. Imagerie *in vivo* de la distribution de ^{99m}Tc-HMPAO

Les résultats de l'imagerie tomographique *in vivo* réalisée sur souris contrôles et transgéniques sont présentés sur la figure 23.

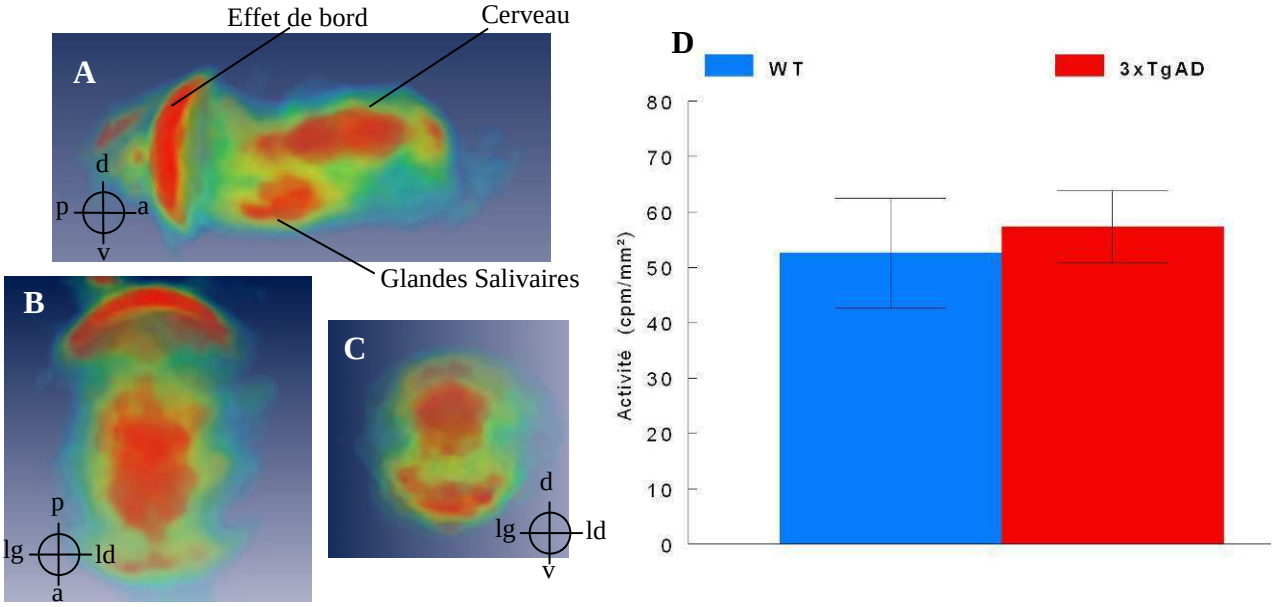


Figure 23: Imagerie cérébrale *in vivo* du ^{99m}Tc-HMPAO chez les souris contrôles et 3xTgAD.

A, B, C: Images représentatives obtenues en TEMP après administration de ^{99m}Tc-HMPAO chez des souris 3xTgAD selon le plan sagittal, coronal et transversal respectivement. On observe de fortes activités (couleurs chaudes) principalement dans le cerveau et les glandes salivaires. L'effet de bord est du à la forte activité dans la région thoracique de la souris. a: antérieur, p: postérieur, d: dorsal, v: ventral, lg: latéral gauche, ld: latéral droit. D: Quantification de l'imagerie *in vivo*. Les résultats sont exprimés en en coups par minutes par unité de surface corrigés de la dose injectée (cpm/mm/DI).

Les résultats de l'imagerie *in vivo* indiquent une forte captation du radiotraceur dans le cerveau ainsi qu'une forte rétention dans les glandes salivaires (Figure 23-A, B et C). La quantification des images ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives entre les animaux contrôles et 3xTgAD de même âge (Figure 23-D).

2. Autoradiographie des coupes de cerveau après administration de ^{99m}Tc-HMPAO

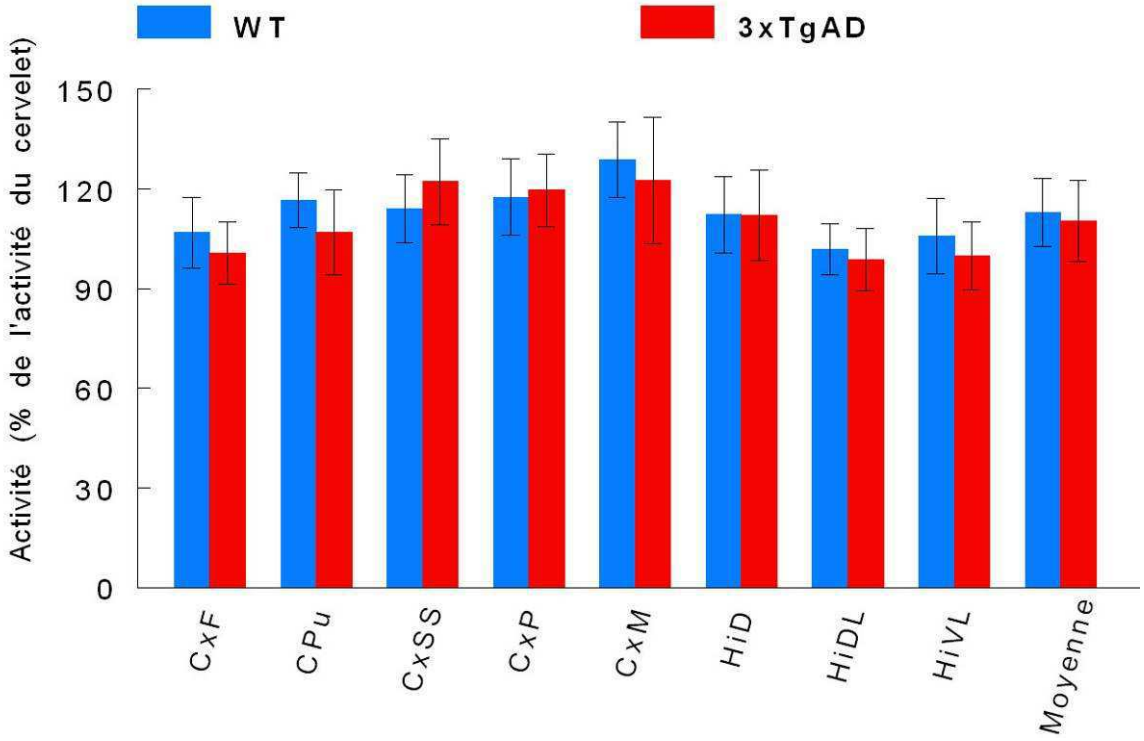


Figure 24: Quantification des images autoradiographiques du ^{99m}Tc-HMPAO chez les souris contrôles et 3xTgAD

Les résultats sont exprimés en % de l'activité du cervelet. CxF: Cortex frontal; CPu: Caudé Putamen; CxSS: Cortex somatosensoriel; CxP: Cortex pariétal; CxM: Cortex moteur; Hi: hippocampe.

Il n'y a pas de différence significative de la captation de ^{99m}Tc-HMPAO entre le groupe de souris WT et le groupe 3xTgAD dans les différentes régions considérées (Figure 24).

C. Discussion

Le ^{99m}Tc-HMPAO est un traceur de la perfusion sanguine cérébrale. C'est un composé lipophile qui possède la capacité de passer la barrière hématoencéphalique et de s'accumuler dans le cerveau de manière proportionnelle au débit sanguin cérébral (Leonard 1986). Chez l'Homme, le ^{99m}Tc-HMPAO permet de mettre en évidence une diminution du débit sanguin cérébral dans la région temporo-pariétal chez les patients atteints de la MA (Vlasenko 1997). L'utilisation de ce radiotraceur pour l'établissement du diagnostic en complément de l'examen clinique permet d'améliorer le diagnostic de MA probable et de MA possible (Jagust 2001). De plus, chez l'Homme, ce radiotraceur permet de suivre de manière longitudinale la diminution progressive de la perfusion cérébrale dans l'hippocampe gauche, la région parahippocampique et le cortex associatif au cours de l'évolution de la maladie (Kogure

2000). Nous avons évalué les éventuelles modifications de la perfusion sanguine cérébrale dans le modèle de souris 3xTgAD.

Dans nos conditions expérimentales, malgré l'utilisation de souris 3xTgAD âgées présentant de nombreuses lésions cérébrales, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de débit sanguin cérébral chez les souris 3xTgAD âgées par rapport aux souris contrôles. La quantification de l'activité cérébrale totale suite à l'imagerie TEMP *in vivo* ne permet pas de différencier les deux groupes d'animaux. Comme pour le ^{18}F-FDG, il est difficile de réaliser des quantifications précises en imagerie TEMP *in vivo* principalement à cause de la résolution spatiale de la caméra (Kuntner 2009). Nous avons donc réalisé l'imagerie autoradiographique de coupes de cerveaux de souris ayant reçu une dose de ^{99m}Tc-HMPAO. L'analyse des activités cérébrales régionales en autoradiographie *ex vivo* ne montre pas de différence entre souris 3xTgAD et souris contrôles.

Bien que ces animaux développent les deux types de lésions cérébrales caractéristiques de la pathologie, il n'y a aucune évidence portant sur une modification de la perfusion sanguine cérébrale. Le champ de la littérature utilisant le ^{99m}Tc-HMPAO pour des études sur la MA chez le petit animal est très peu fourni. Il est cependant certain que ces résultats sont en opposition avec ce qui est décrit chez l'Homme (Vlasenko 1997) et laissent à penser que ce modèle animal n'est pas adapté pour l'étude des altérations des fonctions vasculaires et métaboliques cérébrales.

D. Conclusion

Contrairement à ce qui est observé chez l'Homme, nous n'avons pas pu mettre en évidence de perturbations de la fonction cérébro-vasculaire chez les souris 3xTgAD à l'aide du ^{99m}Tc-HMPAO. Les souris 3xTgAD ne semblent pas développer de perturbations du métabolisme lié à la fonction vasculaire.

II. Evaluation biologique du ^{18}F-FDG

Le ^{18}F-FDG est un analogue du glucose marqué au fluor 18. Il permet de quantifier la captation de glucose (transport et phosphorylation) dans un tissu donné. Dans le cas de la MA, le ^{18}F-FDG est utilisé pour mettre en évidence une diminution de la consommation cérébrale de glucose.

Nous avons évalué la consommation cérébrale de glucose chez des souris 3xTgAD et WT en imagerie *in vivo* et *ex vivo*.

A. Matériels et méthodes

1. Synthèse du ^{18}F-FDG

Le ^{18}F-FDG nous a été gracieusement fourni par le Service de Médecine Nucléaire de l'Hôpital Cantonal de Genève (Suisse) qui en assure la synthèse.

2. Imagerie *in vivo*

2.1. Protocole expérimental *in vivo* du ^{18}F-FDG

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement du ^{18}F-FDG *in vivo* chez la souris 3xTgAD est présenté sur la figure 25.

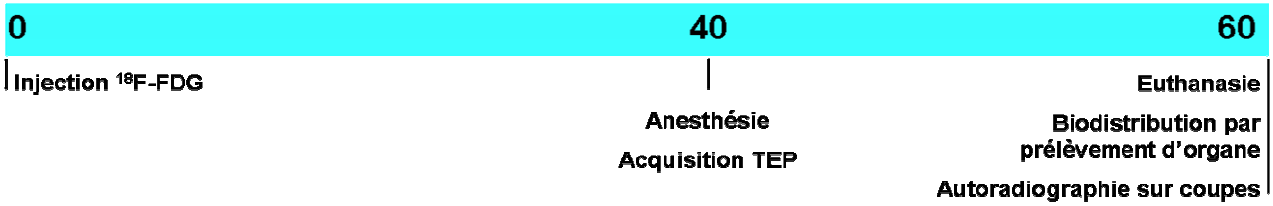


Figure 25: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{18}F-FDG
L'échelle de temps est exprimée en minutes.

2.2. Acquisition des images

Le suivi du ^{18}FDG est réalisé par détection externe de la radioactivité grâce à une caméra Yap-(S)PET dédiée au petit animal (Functional Imaging and Instrumentation Group; FIIG, Pise, Italie) dotée d'une résolution spatiale de 2,1 mm dans le plan axial en mode TEP.

2.3. Analyse des images TEP et quantification

Les données brutes sont converties au format ".hdr" grâce à un programme élaboré sous le logiciel MatLab (MathWorks, Natick, Massachussets, Etats-Unis). L'analyse et la

quantification des images s'effectuent grâce au logiciel PMOD (PMOD Technologies, Zurich, Suisse). La quantification s'effectue sur le volume entier du cerveau. Les données sont exprimées en MBq/voxels et corrigées de la décroissance radioactive par rapport à l'heure d'injection ($T_{1/2}$ = 1,83 heures pour le fluor 18).

3. Analyses *post-mortem*

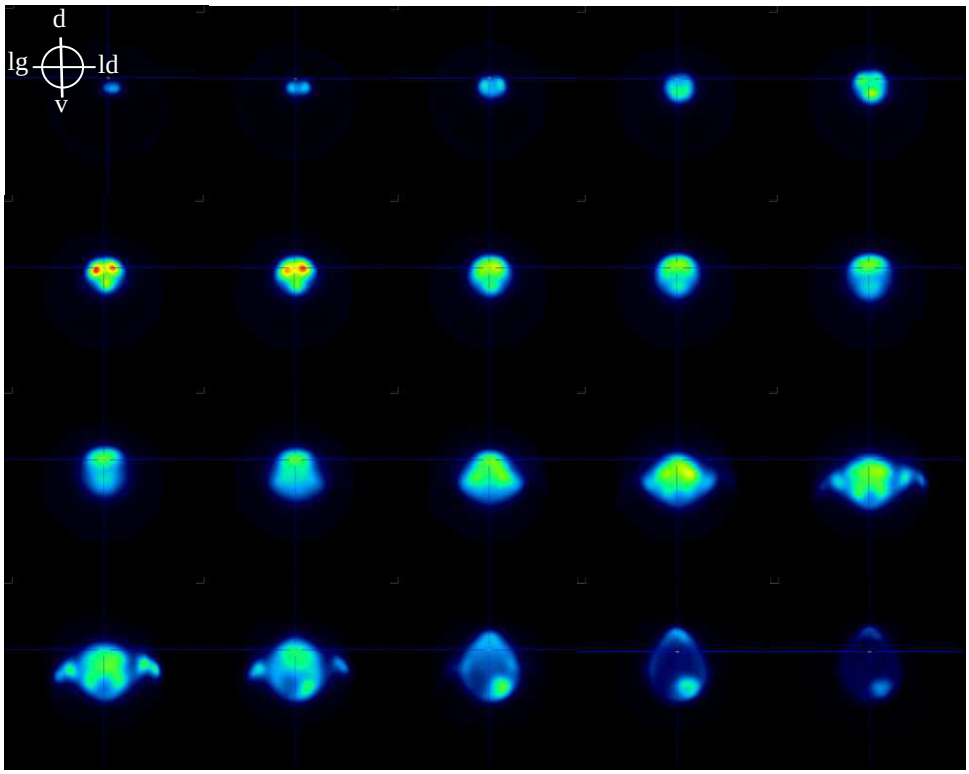
Suite à l'acquisition des images *in vivo*, les animaux sont euthanasiés et des coupes de cerveau de 20 µm d'épaisseur sont réalisées dans le plan transverse comme décrit précédemment (voir partie II.A.I.3.1, page 90). Le protocole pour l'autoradiographie est identique à celui décrit précédemment (voir partie II.A.I.3.2, page 90).

B. Résultats

1.1. Imagerie *in vivo* du ^{18}F-FDG

Les résultats de l'imagerie tomographique TEP *in vivo* sont présentés sur la figure 26.

A



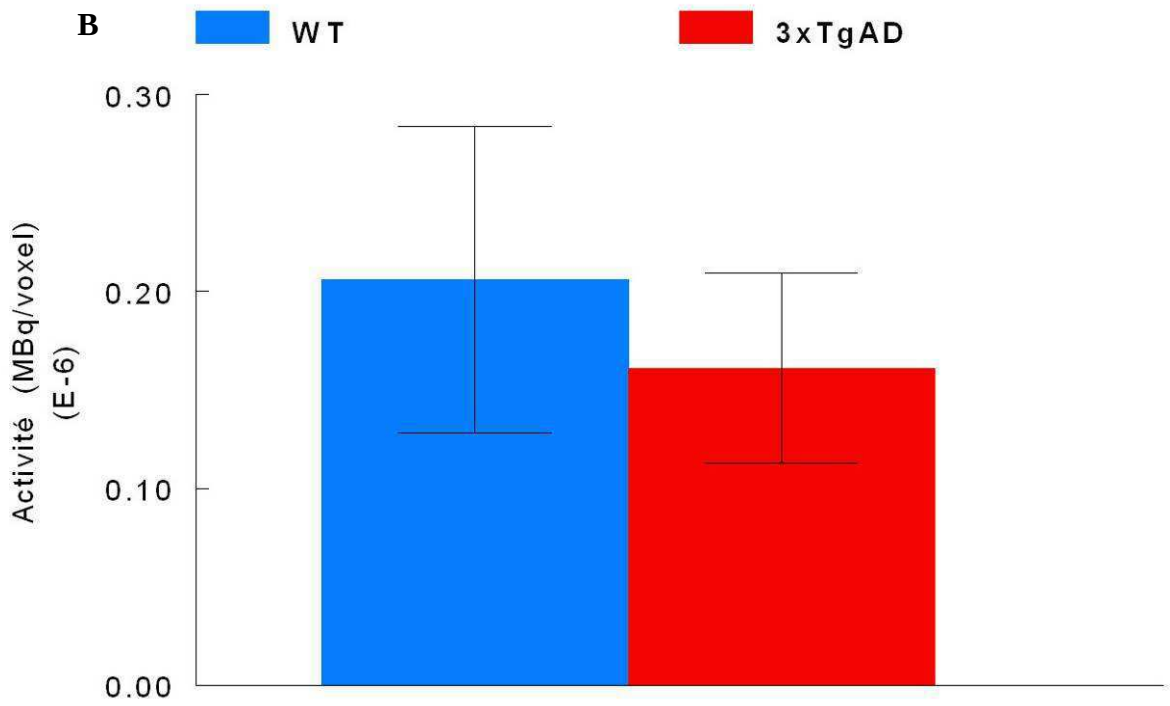


Figure 26: Imagerie TEP *in vivo* du ^{18}F-FDG chez les souris contrôles et 3xTgAD

A: Images cérébrales représentatives obtenues en TEP en coupes transversales successives en allant de l'avant de la tête de l'animal jusqu'à la région thoracique. L'intervalle entre chaque image est de 2 mm approximativement. d: dorsal, v: ventral, lg: latéral gauche, ld: latéral droit. B: Quantification des images TEP chez les souris transgéniques et sauvages. Les résultats sont exprimés en MBq/voxel. n=5/groupes.

Compte tenu de la faible résolution spatiale de la caméra TEP et de la taille réduite du cerveau chez la souris, une seule région d'intérêt est tracée sur le cerveau dans son ensemble, sans distinction de structures. La quantification de l'imagerie TEP *in vivo* n'indique aucune différence significative entre les animaux transgéniques et les animaux contrôles de même âge.

1.2. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris

La quantification des images autoradiographiques est réalisée de façon précise en délimitant des structures d'intérêt: cortex frontal, cortex somato-sensoriel, cortex moteur, caudé-putamen, hippocampe et cervelet. On n'observe aucune différence significative entre les deux groupes de souris (Figure 27).

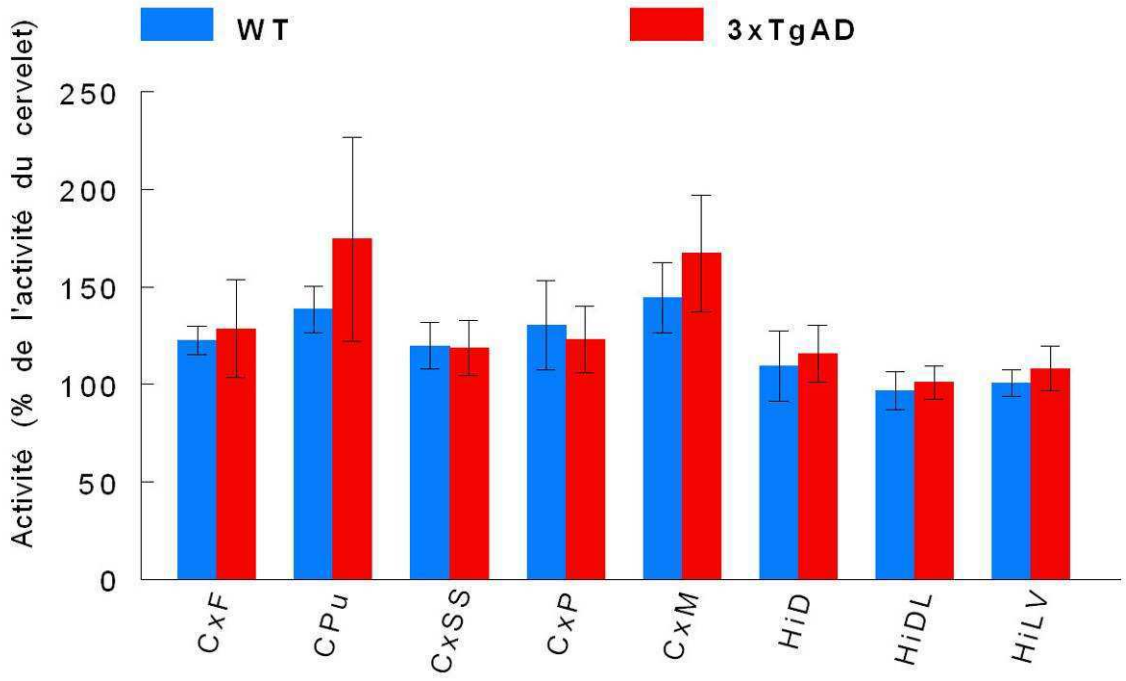


Figure 27: Quantification des images autoradiographiques après administration de ^{18}F-FDG chez les souris contrôles et 3xTgAD

Quantification de l'activité dans des régions cérébrales délimitées. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité mesurée dans le cervelet. n=5/groupe. CxF: Cortex frontal; CPu: Caudé Putamen; CxSS: Cortex somatosensoriel; CxP: Cortex pariétal; CxM: Cortex moteur; HiD/HiDL/HiVL: Hippocampe en position dorsale/dorso-latérale/ventro-latérale.

C. Discussion

Le ^{18}F-FDG est un traceur du métabolisme du glucose. Chez l'Homme, il a été montré une diminution de la consommation cérébrale de ^{18}F-FDG chez des sujets atteints de la MA par rapport à des sujets sains de même âge (Mosconi 2005). Le métabolisme glucidique cérébral (ou CMRGlc pour Cerebral Metabolic Rate of Glucose), mesuré à l'aide du ^{18}F-FDG, est principalement diminué dans le cortex pariéto-temporal et notamment dans le cortex cingulaire postérieur aux stades précoces et asymptomatiques de la maladie et est diminué de manière généralisée à l'ensemble du cerveau aux stades plus avancés (Jagust 2006). L'utilisation du ^{18}F-FDG sur des modèles animaux de la MA pourrait permettre de mieux appréhender les modifications métaboliques qui ont lieu pendant le développement de la pathologie et d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements sur ces aspects. Afin d'évaluer ces modifications éventuelles chez les souris 3xTgAD, nous avons évalué les captations cérébrales de ^{18}F-FDG en imagerie TEP *in vivo* et en imagerie autoradiographique sur coupes.
A l'aide d'une caméra TEP dédiée au petit animal, nous avons mesuré la captation cérébrale de glucose chez des souris 3xTgAD et contrôles de même âge. Malgré l'âge avancé des souris et

le nombre important de lésions amyloïdes et neurofibrillaires dans le tissu cérébral, l'imagerie cérébrale *in vivo* du ^{18}F-FDG n'a pas permis de distinguer les deux groupes d'animaux. La mesure de la quantité de radiotraceur accumulée a été réalisée sur l'ensemble du cerveau. Là encore, la faible résolution spatiale limite fortement la précision de la quantification et ne permet pas d'évaluer des variations localisées de l'activité en ^{18}F-FDG. Les limitations de l'imagerie TEP pour l'évaluation des variations cérébrales métaboliques en ^{18}F-FDG chez le petit animal ont été décrites par ailleurs (Kuntner 2009). Afin de pallier ce manque de précision, nous avons réalisé l'imagerie autoradiographique de coupes de cerveau de souris ayant reçu une dose de ^{18}F-FDG. Cette imagerie ne fait pas apparaître de différence entre les deux groupes de souris dans le cortex frontal, le striatum ou l'hippocampe. Ces résultats diffèrent de ceux exposés par Nicholson *et al*. sur le même modèle de souris (Nicholson 2010). Ces auteurs décrivent une diminution régionale significative de la captation de ^{18}F-FDG chez des animaux âgés de moins de 12 mois et une diminution élargie à l'ensemble des régions cérébrales évaluées chez des animaux âgés de 18 mois par rapport à des contrôles de même âge (27% de diminution globale chez les animaux 3xTgAD âgés de 18 mois). Cependant, la normalisation de la captation de radiotraceur est très différente entre les deux études. En effet, contrairement à notre étude, Nicholson *et al.* ont utilisé des données brutes non normalisées pour les études menées chez les souris les plus âgées. L'activité dans le cervelet étant également diminuée dans cette étude les rapports zone d'intérêt/cervelet seraient proches de ceux obtenus dans nos conditions expérimentales. Les résultats des études menées sur le métabolisme cérébral chez différentes souches de souris transgéniques sont contradictoires. Luo *et al.* (2010) ou Valla *et al.* (2008) décrivent un hyper-métabolisme régional alors que d'autres comme Mosconi *et al.* (2005) ou Reiman *et al.* (2000) décrivent plutôt un hypo-métabolisme s'installant progressivement, notamment au niveau du cortex cingulaire postérieur. Dans notre cas, avec la normalisation que nous appliquons, nous n'observons aucune différence de métabolisme cérébral. En observant les résultats bruts, nous nous trouvons plutôt dans un profil d'hyper-métabolisme étant donné que les activités cérébrales chez les souris 3xTgAD sont plus importantes que chez les contrôles. La variabilité physiopathologique entre les différentes souches de souris transgéniques, les différences de normalisation des résultats ou de conditions expérimentales mises en œuvre (âge des animaux, état métabolique (à jeun ou non), anesthésiques, techniques de mesure…) peuvent expliquer la discordance de ces conclusions.

Dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas d'altération du métabolisme glucidique cérébral chez les souris 3xTgAD pouvant être mise en évidence par le ^{18}F-FDG. Ces résultats

font écho à ceux obtenus avec le ^{99m}Tc-HMPAO. L'absence de différence significative entre des animaux transgéniques et contrôles pour ces deux radiotraceurs du métabolisme pourrait être liée au choix du modèle animal. En effet, bien que les souris 3xTgAD développent des lésions anatomopathologiques proches de celles observées chez les personnes atteintes de la MA, elles ne semblent pas développer de perturbations métaboliques cérébrales au cours du temps. Les lésions tissulaires altèrent les capacités d'apprentissage de ces souris de manière relativement précoces (Billings 2005), comme chez l'Homme, mais n'ont pas le même impact sur les cellules du système nerveux central en terme de métabolisme. Ces résultats laissent à penser que ce modèle animal de la MA ne permet pas d'apprécier des modifications d'ordre métabolique liées à la MA.

D. Conclusion

Il n'y a pas de différences de captation du ^{18}F-FDG entre les souris 3xTgAD et les souris WT. Chez l'Homme, ce radiotraceur permet de mettre en évidence une diminution du métabolisme glucidique cérébral (Mosconi 2005). Ces résultats montrent une limite potentielle de ce modèle animal pour l'étude des altérations métaboliques observées au cours de la MA.

III. Evaluation biologique du ^{125}I-IMPY

Le ^{125}I-IMPY est un traceur des plaques amyloïdes. Il s'agit de l'équivalent iodé du ^{11}C-PIB, marqueur reconnu des plaques amyloïdes chez l'homme. Nous avons réalisé l'évaluation biologique de ce radiotraceur sur le modèle animal de souris 3xTgAD.

A. Matériels et méthodes

1. Radiomarquage et stabilité du radiotraceur

1.1. Protocole de radiomarquage

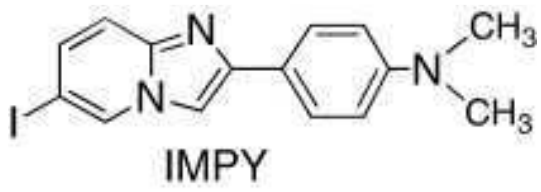


Figure 28: Représentation schématique du ^{125}I-IMPY

Les dérivés organostanniques sont connus pour subir facilement une réaction d'échange avec l'iode à température ambiante. Le ^{125}I-IMPY (Figure 28) a été préparé par la procédure suivante :

50 µg de précurseur stannique IMPY-$SnBu_3$ ont été acidifiés avec 50 µl de HCl 1N et ont été mis en contact avec 20 µl de $Na^{125}I$ (74 MBq) et 50 µl de H_2O_2 3%. La solution a été incubée à température ambiante pendant 10 minutes, stoppée par 100µl de $NaHSO_3$ saturé et neutralisée par 150 µl de $NaHCO_3$ saturé. L'échantillon est alors extrait 3 fois par 1 ml d'éthyle acétate. Après évaporation totale de ce dernier, le résidu marqué est ensuite récupéré dans 500 µl de BSA 2%.

1.2. Analyse du ^{125}I-IMPY après radiomarquage

La pureté radiochimique du ^{125}I-IMPY a été déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur silice C18, avec acétonitrile / eau (50 : 50, v/v) comme solvant de migration.

L'analyse de la pureté radiochimique par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) est effectuée sur une colonne silice greffée, C4 symmetry 300 (Waters®). L'élution est effectuée en utilisant un gradient isocratique acétonitrile-TFA 0,1% / H_2O-TFA 0,1% (90 : 10, v/v) pendant 30 minutes avec un débit de 1 ml / min.

La pureté radiochimique du ^{125}I-IMPY est supérieure à 95% immédiatement après le radiomarquage. Le composé reste stable pendant 48 heures dans la solution de radiomarquage.

1.3. Analyse de stabilité dans le sang et l'urine de souris

Après l'euthanasie de l'animal, réalisée 40 minutes après l'injection du radiotraceur, 1 ml de sang et un échantillon d'urine sont prélevés. L'échantillon de sang est centrifugé pendant 4 minutes à 2000 g, le plasma est prélevé et purifié par centrifugation à 7000g sur filtre Nanosep® 10 kD pendant 20 minutes. L'urine est filtrée sur Nanosep® 10 kD dans les mêmes conditions. Chaque filtrat est analysé par CLHP dans les conditions décrites.

2. Imagerie *in vivo*

2.1. Protocole expérimental *in vivo* du ^{125}I-IMPY

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement du ^{125}I-IMPY *in vivo* chez la souris 3xTgAD est présenté sur la figure 29.

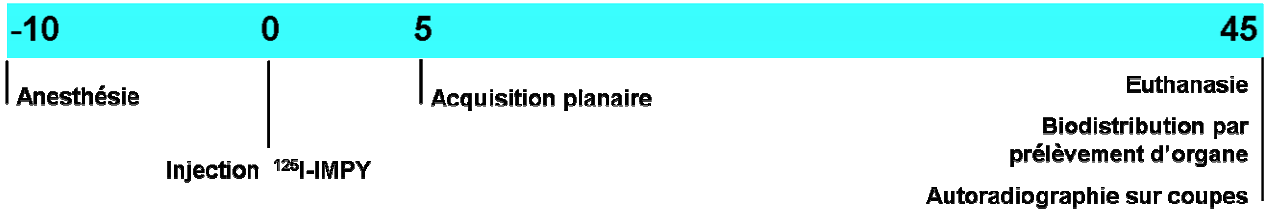


Figure 29: Protocole expérimental *in vivo* pour le ^{125}I-IMPY

L'échelle de temps est exprimée en minutes.

2.2. Acquisition, analyse et quantification des images

Le suivi du composé radioactif ^{125}I-IMPY est réalisé par détection externe de la radioactivité grâce à une γ-caméra dédiée au petit animal (Biospace Mesures, Paris, France). Les acquisitions scintigraphiques sont réalisées en mode planaire à l'aide du logiciel γ-Acquisition (Biospace Lab). L'imagerie planaire a été réalisée en plaçant l'animal au contact de l'une des deux "têtes" de la caméra, directement sur le collimateur. Des collimateurs de type parallèle, spécifiques pour l'iode 125, ont été utilisés. La quantification des images s'effectue à l'aide du logiciel γ-vision+ (BioSpace Lab). Une région d'intérêt (ROI pour region of interest) est tracée sur le cerveau dans son ensemble. La quantité de radioélément est exprimée en coups par minute par unité de surface (cpm/mm²). ($T_{1/2}$ = 59,9 jours pour l'iode 125).

3. Analyses *post-mortem*

3.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau de tissu

La préparation des coupes de cerveau de souris et le protocole d'autoradiographie sont identiques à ceux décrits précédemment dans la partie II.I.A.3, page 90.

3.2. Biodistribution par prélèvement d'organes

Après euthanasie, le sang, la peau, le cœur, les poumons, le foie, la rate, les reins, le muscle squelettique, la paroi de l'estomac, les glandes salivaires, la graisse, l'urine sont prélevés. Les organes sont rapidement rincés puis pesés. L'activité en radiotraceur dans chaque tissu prélevé est mesurée grâce à un compteur γ (Cobra II, Packard instruments) en utilisant une fenêtre énergétique de 15-75 KeV pour la détection de l'iode 125. La biodistribution par prélèvement d'organe est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu frais (%DI/g).

B. Résultats

1.1. Radiomarquage et stabilité de ^{125}I-IMPY

Les analyses de qualité du radiomarquage et de stabilité de ^{125}I-IMPY sont présentées sur la figure 30.

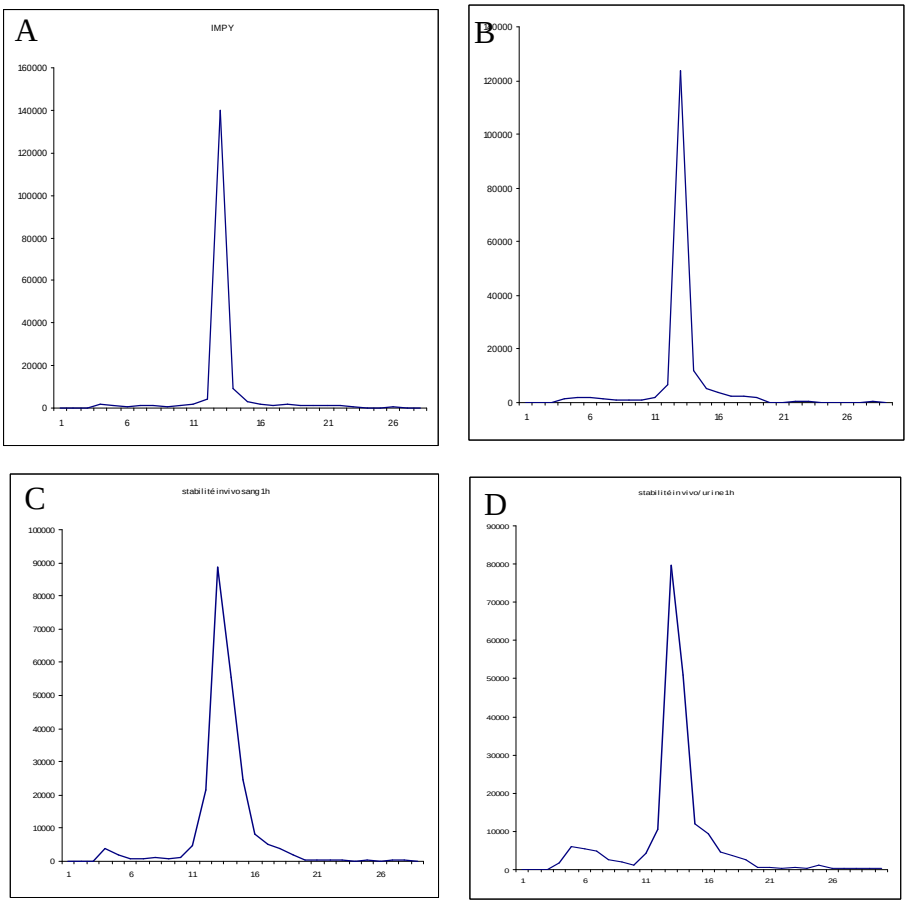


Figure 30: Analyses chromatographiques de ^{125}I-IMPY après marquage et après injection chez l'animal

Exemples de profils CLHP obtenus à l'issue du radiomarquage de ^{125}I-IMPY (A), 24 heures après marquage dans la solution de réaction (B), 1 heure après l'injection chez la souris dans le sang (C) et dans l'urine (D). L'activité est exprimée en coups par minute. Le temps est exprimé en minutes.

Le contrôle qualité effectué à l'issue du radiomarquage indique une bonne pureté radiochimique (PRC) dans la solution de réaction (Figure 30-A) (PRC=97%). Dans cette solution, le produit reste stable pour une période au moins égale à 24 heures (Figure 30-B). La stabilité du radiotraceur est évaluée dans le sang et l'urine une heure après l'injection d'une dose de ^{125}I-IMPY chez la souris (Figure 30 C et D respectivement) (PRC_{sang}=94%, PRC_{urine}=87%). Les profils CLHP obtenus montrent une dégradation négligeable du composé de base notamment dans l'urine. Sur les radio-chromatogrammes, on observe l'apparition d'un pic d'iode libre aux temps d'élution précoces (à 3 minutes environ de temps d'élution). La proportion d'iode libre reste cependant modeste par rapport à la proportion d'iode encore fixée sur le traceur (pourcentage iode libre = 12%). Compte tenu de la dégradation limitée du radiotraceur, la stabilité du radiotraceur dans le sang est jugée suffisante pour les études d'imagerie réalisées jusqu'à 45 minutes p.i.

1.2. Biodistribution par prélèvement d'organes

Les résultats de la biodistribution du ^{125}-I-IMPY sont présentés sur la figure 31.

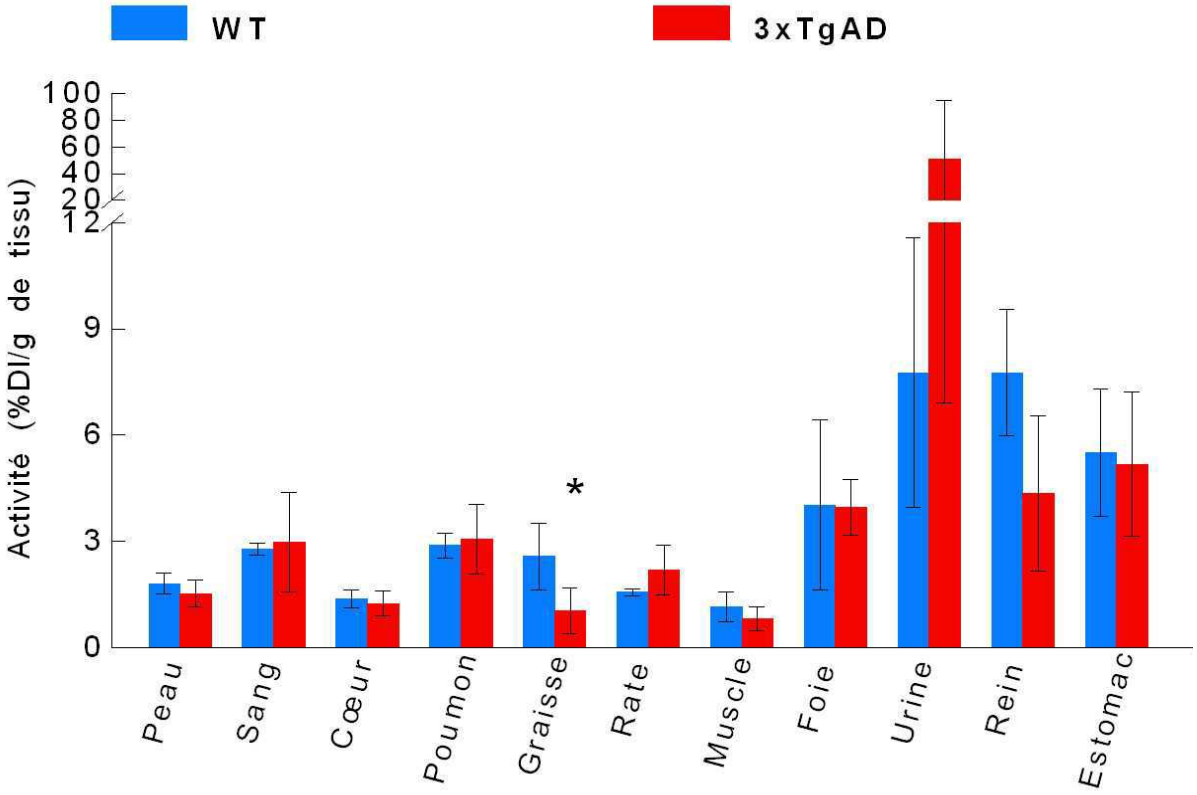


Figure 31: Biodistribution par prélèvement d'organes de ^{125}I-IMPY chez la souris

Le prélèvement d'organes est effectué 45 minutes après l'administration de ^{125}I-IMPY à des souris contrôles et 3xTgAD. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%DI/g). n=4/groupe. * p<0,05.

Le ^{125}I-IMPY est éliminé par les voies rénale et hépato-biliaire dans des proportions équivalentes. Aucune différence significative n'apparaît entre les animaux contrôles et 3xTgAD hormis dans la graisse (p=0,042). La thyroïde et l'estomac présentent des activités relativement importantes pouvant représenter une désiodation significative du radiotraceur.

1.3. Quantification de l'imagerie planaire *in vivo*

Les résultats de la quantification de l'imagerie planaire du ^{125}I-IMPY chez la souris sont présentés sur la figure 32.

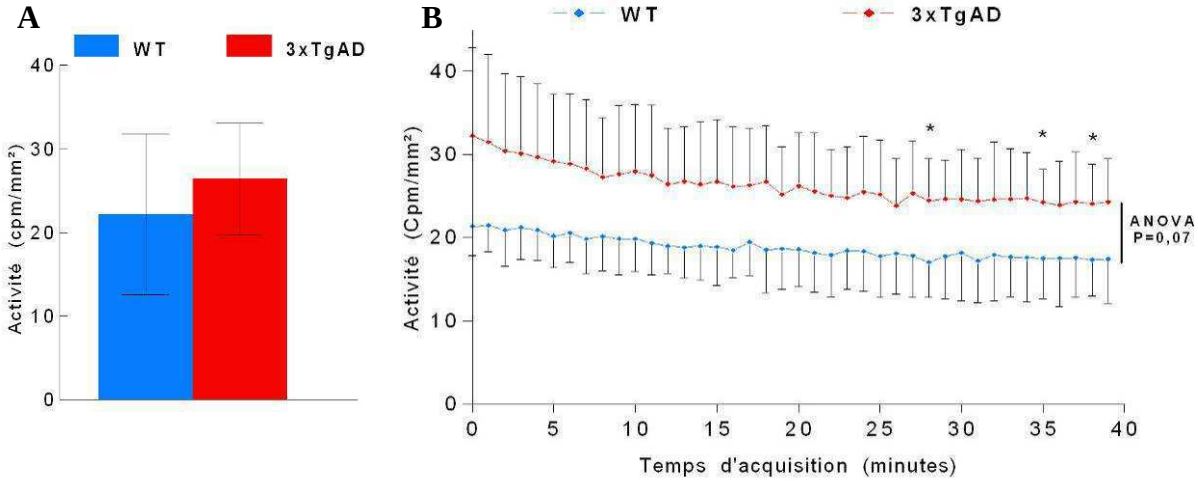


Figure 32: Quantification de l'imagerie planaire de ^{125}I-IMPY

L'imagerie est réalisée de 0 à 40 minutes après l'injection du radiotraceur. A: Quantification de l'activité dans le cerveau pendant toute la durée de l'imagerie. Les valeurs sont données pour l'ensemble des 40 minutes. B: Quantification de l'activité dans l'ensemble du cerveau à partir de l'imagerie réalisée de 0 à 40 minutes. Les valeurs sont données pour chaque minute entre 0 et 40 minutes. n=5 par groupe. * p<0,05: 3xTgAD vs WT.

La quantification des images *in vivo* ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les groupes de souris WT et 3xTgAD de même âge si l'on prend en compte la moyenne de l'acquisition dans son ensemble (p=0,45) (Figure 32-A). Un test ANOVA est utilisé afin de comparer l'évolution des cinétiques cérébrales du ^{125}I-IMPY (Figure 32-B). Ce test ne montre pas de différence entre les deux groupes d'animaux considérés (p=0,066). Lors de l'analyse des résultats des cinétiques de ^{125}I-IMPY dans le cerveau, les valeurs sont également comparées point par point c'est-à-dire toutes les minutes grâce à un test statistique de Student. Selon ce dernier test, trois valeurs de quantification situées dans les dix dernières minutes de l'acquisition s'avèrent significativement différentes: à 29, 36 et 39 minutes après le début de l'acquisition des images (p<0,05).

1.4. Quantification des images autoradiographiques sur coupes de cerveau dans les zones riches en plaques amyloïdes

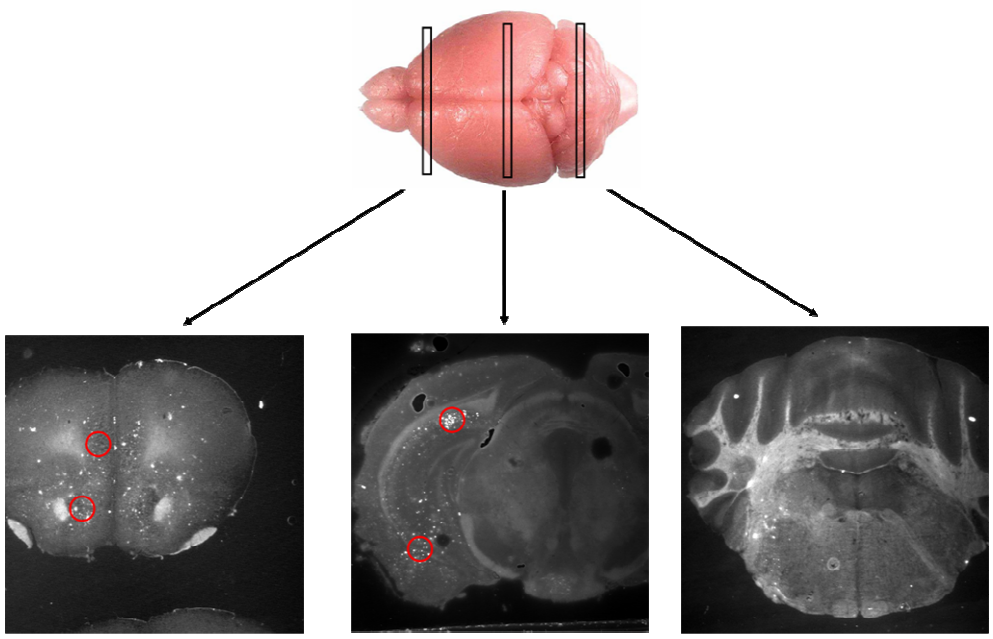


Figure 33: Mise en évidence des régions à forte densité de plaques amyloïdes

Les régions riches en plaques amyloïdes sont mises en évidence par un marquage fluorescent à la thioflavine S sur des coupes transversales réalisées au niveau du cortex frontal, de l'hippocampe et du cervelet (à gauche, au milieu et à droite respectivement). Les PA sont nombreuses dans le cortex frontal et l'hippocampe mais complètement absentes du cervelet.

Les régions riches en plaques amyloïdes sont mises en évidence par un marquage à la thioflavine S sur les mêmes coupes de tissus préalablement analysées en autoradiographie (Figure 33). Les régions riches en plaques amyloïdes sont situées dans le cortex frontal, le bulbe olfactif ainsi que dans deux parties de l'hippocampe: le subiculum et l'amygdale. Le cervelet est une région dépourvue en PA et sert de zone de référence pour la quantification.

La quantification des images autoradiographiques est réalisée en faisant correspondre les zones d'intérêt avec ces régions riches en plaques amyloïdes (Figure 34). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité dans le cervelet.

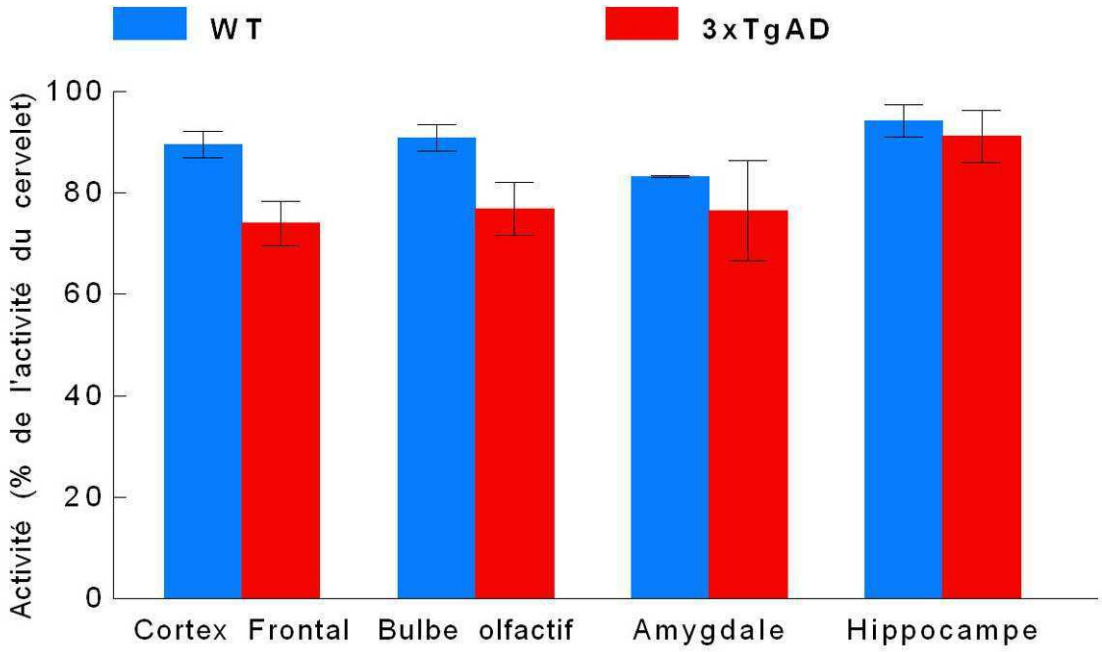


Figure 34: Quantification des images autoradiographiques dans les zones riches en plaques amyloïdes

Les zones d'intérêt sont tracées sur les zones riches en plaques amyloïdes. L'activité est mesurée 45 minutes après l'injection du radiotraceur. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité du cervelet. n=2 par groupe.

Contrairement à ce qui était attendu, l'activité semble moins importante chez les souris 3xTgAD que chez les souris contrôles de même âge dans les quatre régions considérées comme étant riches en plaques amyloïdes. Ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

C. Discussion

Parmi les radiotraceurs TEMP développés pour la détection des plaques amyloïdes, le ^{123}I-IMPY est l'un des marqueurs présentant le plus d'intérêt. Il a été montré dans la littérature que ce dérivé de la thioflavine pénétrait dans le cerveau de souris de manière importante (7,2%DI/g de tissu, deux minutes après injection) et qu'il permettait de déterminer la localisation des plaques amyloïdes sur des coupes de cerveau en corrélation avec un marquage à la thioflavine (Kung 2002).

Nous avons évalué le comportement du ^{125}I-IMPY dans notre modèle murin de la MA: la souris 3xTgAD. L'élimination du radiotraceur est assurée par la voie rénale et la voie hépato-biliaire dans des proportions équivalentes. Le radiotraceur est rapidement dégradé une fois injecté à l'animal aux vues des activités élevées relevées dans l'estomac et la thyroïde, organes témoins de la présence d'iode libre, en raison des nombreux transporteurs NaI contenus dans

leurs parois. Ces données confirment les résultats obtenus chez l'Homme qui montraient une dégradation rapide du radiotraceur (80 et 20% de ^{123}I-IMPY intact à 2 et 30 minutes post injection respectivement) (Newberg 2006). Les données de l'imagerie *in vivo* ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les animaux transgéniques et contrôles. Cependant une analyse ANOVA montre une tendance vers une évolution différente des cinétiques d'activité dans le cerveau entre les deux groupes ($p=0,07$). De plus, les temps d'acquisition plus tardifs (29, 36 et 39 min) semblent plus propices pour distinguer des variations d'activité ($p<0,05$). Les quantifications de l'autoradiographie réalisées sur les coupes de cerveau des animaux ayant subi l'imagerie ne permettent pas de confirmer cette tendance. En effet, les quantifications de l'autoradiographie en utilisant des zones d'intérêt circonscrites au niveau des zones riches en plaques amyloïdes indiquent une tendance d'une activité moins importante chez les animaux transgéniques par rapport aux contrôles. Ces résultats bien que non significatifs vont à l'encontre de ce qui était attendu et des données décrites dans la littérature. D'après Kung *et al.* (2002), le meilleur rapport signal sur bruit et les meilleurs résultats ont été obtenus en autoradiographie quatre heures après l'administration des radiotraceurs à des souris double-transgéniques Tg2576. A ce temps, Kung *et al.* décrivent une co-localisation partielle des images autoradiographiques obtenues après administration de ^{125}I-IMPY avec les images obtenues après marquage fluorescent des PA à l'aide de la thioflavine S. Nous n'avons pas pu reproduire ces résultats dans les temps courts étudiés (45 minutes). Il est possible qu'à ce temps d'observation la forte fixation non spécifique de ces molécules sur les lipides masque les résultats. L'évaluation du radiotraceur aux temps longs (4 heures) chez la souris 3xTgAD devra donc faire l'objet d'études ultérieures afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

D. Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas de différence de captation du ^{125}I-IMPY entre les souris 3xTgAD et WT. L'évaluation de ce radiotraceur à des temps plus longs pourrait améliorer le rapport signal sur bruit et permettre la distinction des deux groupes d'animaux.

Partie III : Développement de nouveaux radiotraceurs pour le suivi de la MA

Le développement de nouveaux radiotraceurs pour le suivi de la MA *in vivo* est un enjeu majeur afin de mieux appréhender les aspects dynamiques de cette pathologie. Les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires sont deux lésions cérébrales caractéristiques de la MA. Nous avons initié le développement de deux radiotraceurs des plaques amyloïdes: les para-^{35}S-sulfonato-calix[4]arènes (ou ^{35}S-calixarènes) et les COB. Parallèlement, nous avons initié la mise au point d'un radiotraceur des dégénérescences neurofibrillaires: le peptide A93, et de vecteurs qui permettront de faciliter le passage de la barrière hématoencéphalique: C6 et C3. Ces différentes molécules sont présentées brièvement dans le tableau 7 et les protocoles expérimentaux mis en œuvre sont récapitulés dans le tableau 8.

Radiotraceur évalué	Mode de détection	Cible visée
^{35}S-Calixarènes	Radiomarquage au ^{35}S	Plaques amyloïdes
COB	Fluorescence	Plaques amyloïdes
A93	Radiomarquage au ^{99m}Tc	Dégénérescences neurofibrillaires
C6	Radiomarquage au ^{99m}Tc	Vecteur peptidique
C3	Radiomarquage au ^{99m}Tc	Vecteur peptidique

Tableau 7 : Composés évalués pour la mise au point de nouveaux radiotraceurs pour le suivi de la MA

Radiotraceur évalué	Liaison sur coupes	Imagerie tomographique	Biodistribution	Autoradiographie *ex vivo*
^{35}S-Calixarènes			x	x
COB	Voir la liste des protocoles effectués pour l'évaluation des COB plus bas			
A93	x	x	x	x
C6			x	x
C3			x	x

Tableau 8 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque radiotraceur étudié

I. Evaluation biologique des para-^{35}S-sulfonato-calix[4]arènes

Les para-sulfonato-calix[4]arènes ou calixarènes sont des molécules issues de la chimie de synthèse. Les calixarènes ont la capacité de fixer les feuillets β-croisés, motifs que l'on retrouve notamment dans les agrégats de peptides β-amyloïdes (Cecillon 2007). Elles n'avaient jusqu'alors jamais été évaluées *in vivo*. Nous avons dans un premier temps souhaité savoir si ces molécules étaient capables de passer la barrière hématoencéphalique et quelle était leur distribution dans l'organisme. Nous avons donc réalisé la première biodistribution par prélèvement d'organes de ces molécules chez la souris. Ce travail est le fruit d'une collaboration avec l'équipe de chimistes d'Anthony Coleman (UMR 5086 – Lyon). Cette expérience a été menée sur des souris contrôles WT ne présentant pas de lésions cérébrales pour l'étude du passage de la barrière hématoencéphalique. Le prélèvement est réalisé à 5, 15 30 ou 45 minutes suite à l'injection d'une dose de calixarènes marqués au ^{35}S. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Coleman 2008).

A. Matériels et méthodes

1. Synthèse et radiomarquage

Le radiomarquage des calixarènes au ^{35}S ($T_{1/2}$ = 87,32 jours pour le soufre 35) a été réalisé par l'équipe du professeur Tony Coleman de l'IBCP de Lyon comme décrit dans la publication de Coleman *et al.* (2008) (Figure 35). Le marquage est effectué dans la dernière étape de sulfonation de la voie de synthèse des calixarènes. Pour cela, une quantité minimale de 1 g de para-sulfonato-calix[4]arènes et de 4 ml de H_2SO_4 est nécessaire. Le mélange est chauffé à 90°C pendant 4 heures dans une bouteille à fond rond de 50 ml. Après retour à température ambiante, les para-^{35}S-sulfonato-calix[4]arènes sont isolés des molécules froides en ajoutant 1 ml de méthanol à la solution de marquage puis en additionnant cette préparation à 300 ml d'éthyle acétate. Cette solution est mise sous agitation pendant 30 minutes puis filtrée et lyophilisée. Ce protocole de synthèse permet d'obtenir une pureté de 95% pour la production de ^{35}S-calixarènes. Cependant pour des raisons de radioprotection seulement 100 µl des 4 ml de ^{35}S-H_2SO_4 ont été utilisés, ce qui implique que seulement 2,5% des groupes

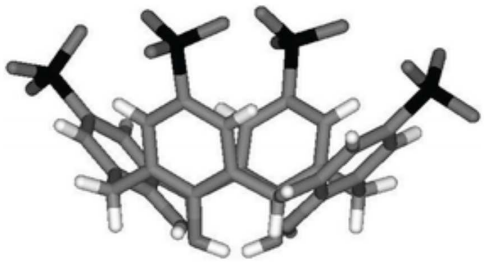


Figure 35: Représentation schématique de la structure du para-sulfonato-calix(4)arène

sulfonatés ont été effectivement radiomarqués. L'activité spécifique s'en trouve affectée avec 0,74 kBq.M^{-1}.

2. Protocole expérimental pour l'évaluation des ^{35}S-calixarènes.

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement du ^{35}S-calixarène chez la souris 3xTgAD est présenté sur la figure 36.

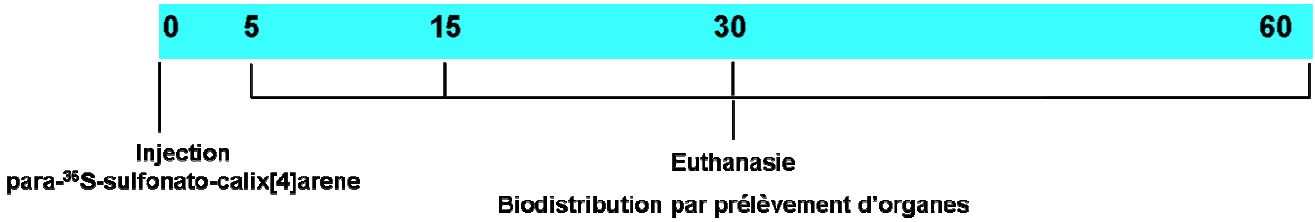


Figure 36: Protocole expérimental pour le ^{35}S-Calixarène

L'échelle de temps est exprimée en minutes.

Plusieurs groupes de souris ont été formés en fonction de la durée du protocole (5, 15, 30 et 60 minutes post-injection) et de la concentration administrée (40; 100; 200; 400 mg/kg soit environ 1; 2,5; 5; 10 mg / animal respectivement). Les radiotraceurs sont injectés dans l'une des veines latérales de la queue. Les animaux sont anesthésiés pour la durée de l'imagerie par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (50 mg/kg) / xylasine (10 mg/kg) en rapport 2/3 et 1/3 à raison de 1 ml/kg. L'activité injectée est de l'ordre de 1 kBq pour 1 mg de produit injecté.

3. Analyses *post-mortem*

3.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau

Après administration des ^{35}S-calixarènes à des souris WT, les animaux sont euthanasiés à différents temps. La préparation des coupes de cerveau de souris ainsi que le protocole d'autoradiographie sont décrit partie II.I.A.3.1, page 90.

3.2. Biodistribution des ^{35}S-calixarènes par prélèvement d'organes

Ce protocole a été utilisé pour réaliser la biodistribution des ^{35}S-calixarènes. Après euthanasie, les organes d'intérêt sont prélevés rapidement rincés puis pesés. Les organes sont ensuite mis à digérer dans un solvant organique, le BTS450 (Beckman Tissue Solubilizer, Beckman, USA), dans des flacons en verre à 60°C jusqu'à digestion complète (au moins une nuit). Après digestion complète des tissus, la solution obtenue est reprise dans des tubes en

plastique spécifiques pour compteur β avec 500 µl d'échantillon digéré, 100 µl de péridrol pour la décoloration (Sigma, USA), 40 µl d'acide acétique pour la neutralisation (Chromoform, Prolabo) et 10 ml de liquide scintillant pour permettre la détection (Ready Safe, Beckman Coulter, USA). L'activité dans chaque flacon est ensuite mesurée grâce à un compteur β- et obtenue en coups par minutes. La biodistribution par prélèvement d'organe est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu frais (%DI/g).

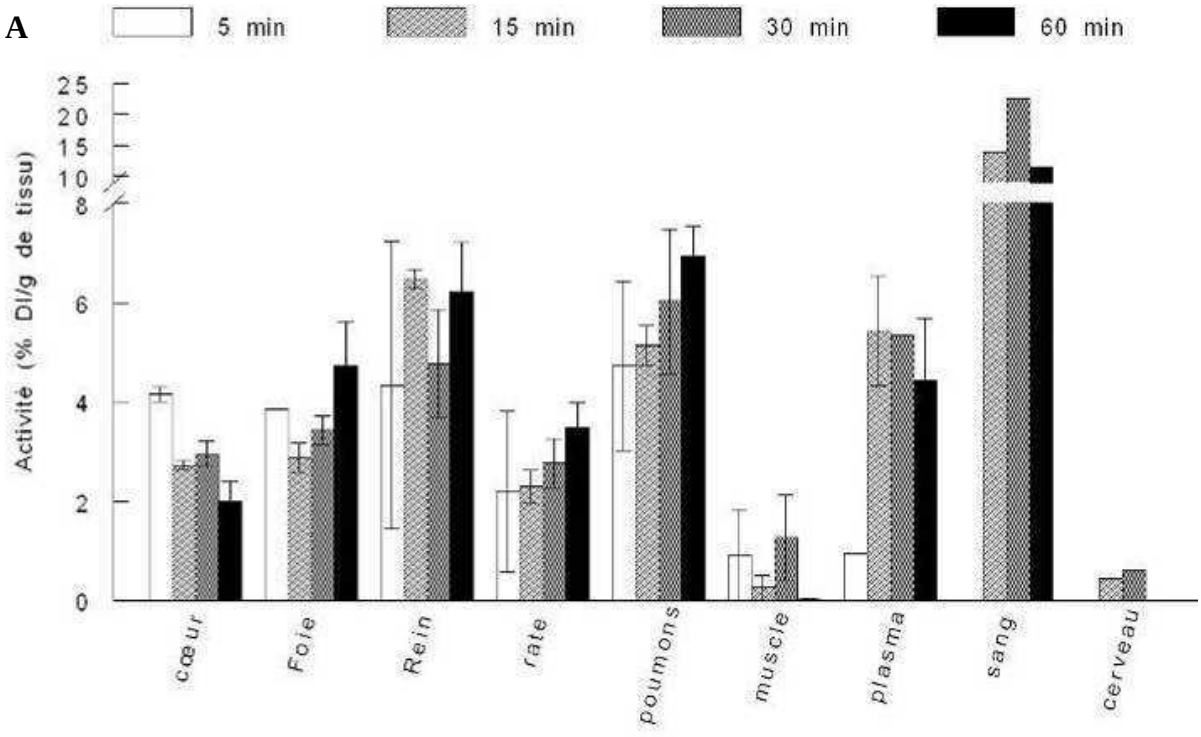
B. Résultats

1.1. Biodistribution par prélèvement d'organes

La première concentration évaluée, 400 mg/kg, s'est avérée létale. Immédiatement après l'injection d'une dose de 400 mg/kg de ^{35}S-calixarènes, l'animal présentait des signes de comportement anormal (difficultés à se déplacer, difficultés respiratoires…). L'animal est décédé dans les dix premières minutes après l'injection du radiotraceur.

Nous avons donc diminué la dose maximale évaluée à 200 mg/kg. Lors de la biodistribution par prélèvement, nous avons mis en évidence la présence de sang dans les urines, signe d'une toxicité encore prononcée à cette concentration.

Nous avons diminué encore une fois les doses injectées pour retenir des concentrations de ^{35}S-calixarènes de 40 et 100 mg/kg. Les résultats de ces biodistributions par prélèvement d'organes sont présentés sur la figure 37.



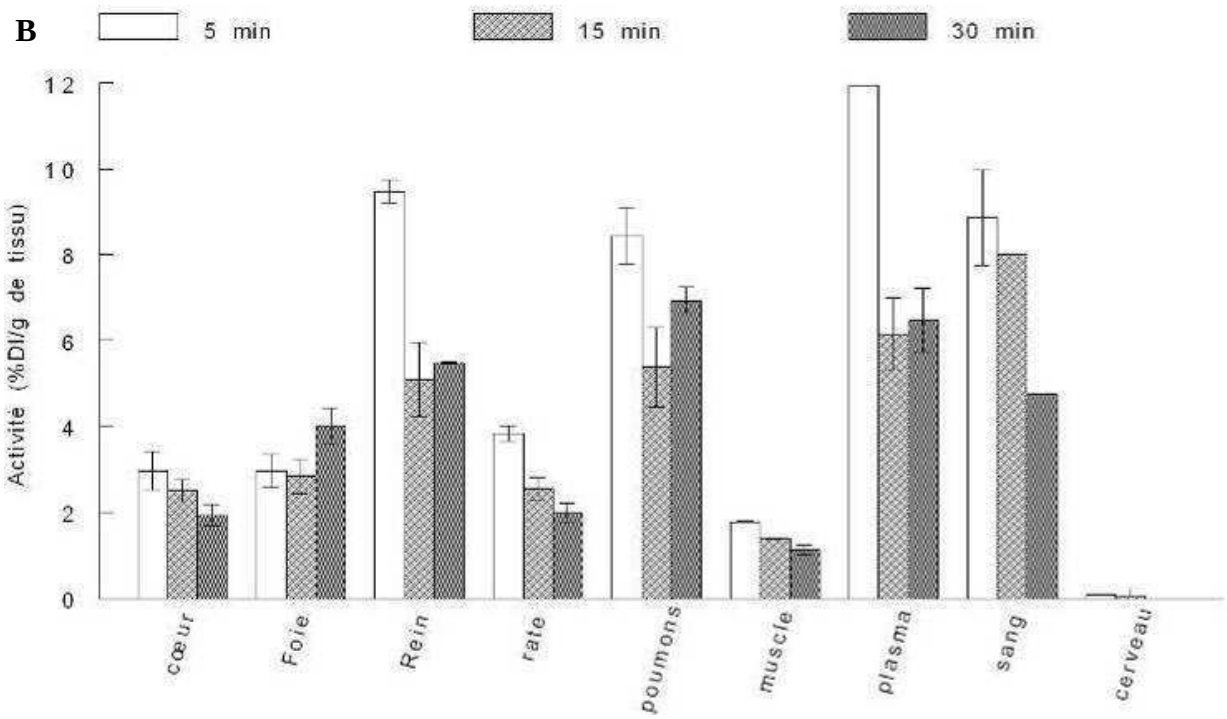


Figure 37: Biodistribution des ^{35}S-calixarènes par prélèvement d'organes

La biodistribution est réalisée par prélèvement d'organes à différents temps après administration de différentes doses de ^{35}S-calixarènes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu frais (%DI/g). A: Biodistribution après administration de 40 mg/kg de ^{35}S-calixarènes. B: Biodistribution après administration de 100 mg/kg de ^{35}S-calixarènes.

Les résultats de la biodistribution montrent l'incapacité des ^{35}S-calixarènes à passer la barrière hématoencéphalique (Figure 37). L'activité sanguine est maximale 15 minutes après l'injection du radiotraceur et décroît ensuite au cours du temps. L'élimination du radiotraceur est essentiellement assurée par la voie rénale et dans une moindre mesure par la voie hépatobiliaire.

L'évolution de la quantité de traceur au cours du temps dans l'urine est différente selon la dose considérée (Tableau 9): à 40 mg/kg, l'activité a tendance à augmenter au cours du temps alors qu'elle a plutôt tendance à diminuer à 100 mg/kg. Cette différence est représentative des quantifications réalisées dans le rein qui montrent un comportement variable de la molécule en fonction de la dose administrée.

Temps après injection du radiotraceur	Activité pour la dose à 40 mg/kg	Activité pour la dose à 100 mg/kg
5	ND	35,45 ± 23,36
15	3,44 ± 2,15	26,8
30	16,6 ± 6,71	15,44 ± 6,46
60	14,77	ND

Tableau 9 : Evolution de l'activité au cours du temps dans l'urine

Le temps est exprimé en minutes. L'activité est exprimée en pourcentage de la dose injectée pour 50 µl d'urine. ND: non déterminé.

1.2. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris

L'activité dans le cerveau était trop faible pour pouvoir être quantifiée en autoradiographie. Les zones d'intérêt étant impossibles à réaliser compte tenu de la trop faible intensité du signal relevé, aucune valeur de quantification n'a pu être établie en autoradiographie. Ces données confirment l'incapacité des ^{35}S-calixarènes à franchir la BHE.

C. Discussion

Les calixarènes sont des molécules issues de la chimie supramoléculaire reconnues en tant que système "hôte" d'intérêt grâce à leur cavité hydrophobe pouvant accueillir des molécules organiques neutres ou chargées (Coleman 2007). L'activité biologique des calixarènes a été préalablement évaluée dans différentes études (Perret 2006). Ainsi, ce composé pourrait être utilisé en tant qu'agent antiviral, inhibiteur de canaux ioniques, anti-coagulant, amplificateur pour la détection des formes pathogéniques de prion, ainsi qu'outil diagnostique pour la MA (Coleman 2008). Les calixarènes ont la capacité de fixer les motifs feuillets β croisés, motifs que l'on retrouve notamment dans les agrégats de peptides β-amyloïdes (Cecillon 2007).

Plusieurs études ont été menées avec succès afin de démontrer l'innocuité des calixarènes *in vitro*. Les calixarènes ne présentent pas de toxicité sur des lignées de cellules tumorales *in vitro*, ni d'activité hématolytique pour des concentrations allant jusqu'à 5 mM, et ne déclenchent pas de réponse immunitaire aspécifique (Coleman 2008). Aucune étude *in vivo* n'avait été réalisée jusqu'alors. Dans ce contexte, nous avons effectué la première caractérisation de ces molécules *in vivo* chez l'animal. Notre intérêt était d'évaluer les propriétés de ces composés en tant que traceur des dépôts amyloïdes et en tant que vecteur potentiel de molécules vers ces lésions.

L'administration d'une seule dose de 400 mg/kg conduit au décès de l'animal dans les 10 premières minutes qui suivent l'injection. La présence de sang dans les urines 60 minutes après l'administration d'une seule dose de 200 mg/kg atteste d'une toxicité encore prononcée à cette concentration. Les concentrations plus faibles, 40 et 100 mg/kg n'ont pas induit d'effet toxique visible à court terme. Le comportement des animaux et l'aspect des organes internes sont en effet normaux. La toxicité à court terme chez la souris est donc considérée comme faible pour des concentrations inférieures à 100 mg/kg.

La biodistribution par prélèvement d'organes ne fait pas apparaître d'accumulation majeure dans un organe particulier. L'élimination par la voie urinaire est rapide. L'activité sanguine est maximale 15 minutes après l'injection du radiotraceur. Les ^{35}S-calixarènes ne passent pas la barrière hématoencéphalique dans les conditions testées. Ce résultat peut s'expliquer par la taille importante de ces composés et leur forte charge anionique. Il faut cependant noter que pour des raisons de radioprotection pour les manipulateurs durant le radiomarquage, la quantité de ^{35}S utilisée pour la réaction de marquage a été réduite. De ce fait, l'activité spécifique était très faible (0,74 kBq.M^{-1}) ce qui a pu péjoré les résultats notamment en ce qui concerne le passage de la BHE.

Les calixarènes pourraient avoir de nombreuses utilisations *in vivo* notamment en tant que vecteurs de molécules à travers l'organisme. Cependant, en l'état, l'utilisation de ce composé en tant que traceur ou vecteur dans la maladie d'Alzheimer semble incertaine compte tenu de sa très faible capacité à passer la BHE. Malgré tout, les calixarènes sont des molécules aisément modulables. La modification des propriétés anioniques et de lipophilie pourrait grandement améliorer le passage de la BHE dans des études ultérieures.

D. Conclusion

Les résultats obtenus pour ce nouveau traceur des plaques amyloïdes : les ^{35}S-calixarènes, sont contrastés. La capacité des ^{35}S-calixarènes à passer la barrière hématoencéphalique et à se fixer sur les lésions amyloïdes *in vivo* est fortement limitée. La modification des propriétés chimiques de ces composés est nécessaire et une nouvelle évaluation biologique sera réalisée prochainement.

II. Evaluation biologique des molécules fluorescentes COB

Les COB sont des dérivés de proflavine naturellement fluorescents capables d'interagir avec les peptides amyloïdes *in vitro*. Huit composés ont été synthétisés: COB 231, COB 231_{dim}, COB 232, COB 233, COB 234, COB 239, COB 252, COB 253. Nous avons voulu évaluer les caractéristiques de ces molécules *in vitro* et *in vivo* afin de pouvoir les utiliser en tant que traceur des dépôts amyloïdes dans notre modèle animal de MA. Ces travaux sont le fruit d'un travail collaboratif avec différentes équipes: Martine Demeunynck et Sabine Chierici (UMR 5250 – Grenoble) pour la partie chimie, et Monique Touret (INSERM U842 – Neuro-Oncologie et Neuro-Inflammation – Lyon) pour les études sur cultures cellulaires. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Garin 2011).

A. Matériels et méthodes

1. Description des molécules évaluées

Les formules des différents composés COB synthétisés et évalués sont données dans le tableau 10.

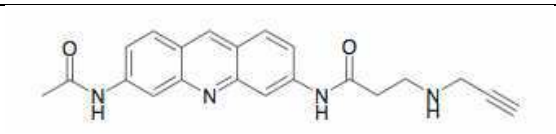
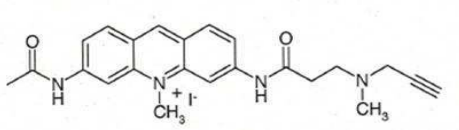
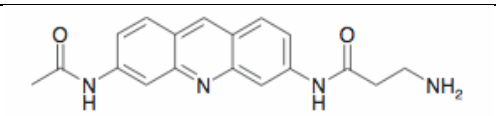
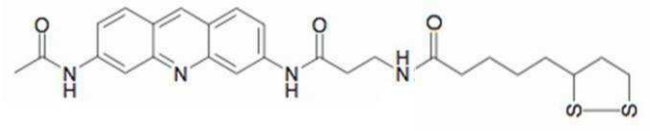
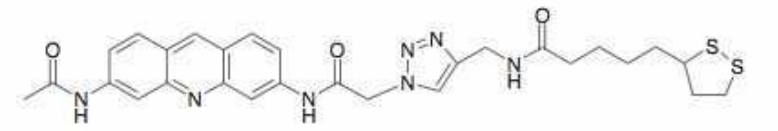
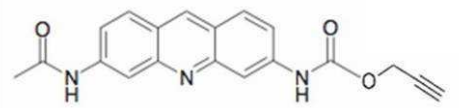
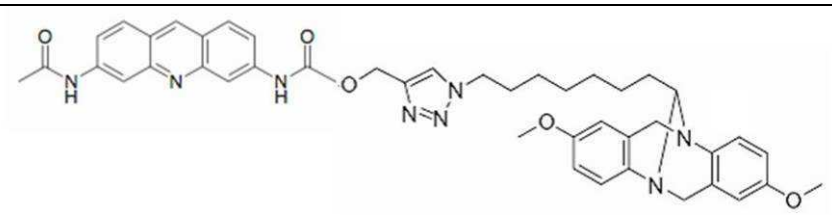
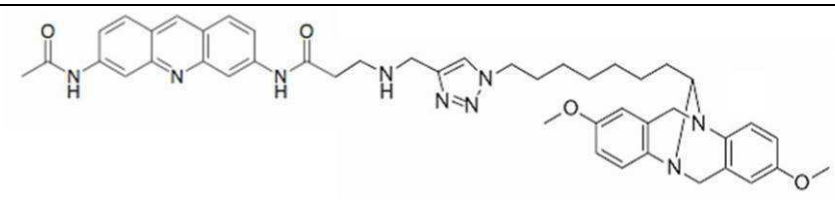
Molécules évaluées	Formules
COB 231	
COB 231$_{dim}$	
COB 232	
COB 233	
COB 234	
COB 239	
COB 252	
COB 253	

Tableau 10 : Formules des composés fluorescents étudiés

2. Protocoles effectués pour l'évaluation des COB

Les différents protocoles réalisés pour l'évaluation biologique des COB sont décrits dans le tableau 11. Les études d'inhibition de la formation des fibres amyloïdes *in vitro* ont été réalisées par Sabine Chierici et Martine Demeunynck (UMR 5250 – Grenoble). L'évaluation des COB sur cultures cellulaires a été réalisée en collaboration avec Monique Touret (INSERM U842 – Neuro-Oncologie et Neuro-Inflammation – Lyon).

Composé évalué	Inhibition de la fibrillation *in vitro*	Liaison sur coupes	Evaluation sur cultures cellulaires	Evaluation *in vivo*
COB 231	x	x	x	x
COB 231_{dim}	x	x	x	x
COB 232	x	x		
COB 233	x	x		
COB 234	x	x		
COB 239	x	x		
COB 252	x	x		
COB 253	x	x		
IMPY		x	x	x

Tableau 11 : Liste des protocoles expérimentaux effectués pour chaque COB évalué

3. Synthèse des COB

Tous les composés ont été préparés à partir du 3-acétyl-6-aminoacridine et pour la plupart à partir d'une simple précipitation (Figure 38). Le composé COB 239 a été préparé par substitution du propargyl chloroformiate. Cette réaction en une seule étape permet d'obtenir un rendement de 75%. L'introduction des extrémités "amino-", "azide" ou des bras espaceurs "alkyne" pour les dérivés COB 232 et COB 231 a nécessité des étapes additionnelles. Les rendements de réaction pour les composés COB 232 et COB 231 sont de 30%, 75% et 65% respectivement. Les hétérodimères d'acridine avec acide lipoïque et base Tröger (COB 233, COB 234, COB 252, COB 253) ont été préparés à partir des composés COB 231, 232 et 239 par ligation via une amide ou un pont triazole en utilisant une cycloaddition azide-alkyne catalysée par le cuivre. La procédure commune utilisant le sulfate de cuivre II et l'ascorbate de sodium en tant qu'agent de réduction dans une solution de tbutanol/eau a montré de bons résultats et les hybrides COB 234, 252, 253 ont été obtenus avec des rendements satisfaisants (70-75%). Le dérivé lipoïque et l'analogue de la base Tröger ont été produits comme des produits racémiques.

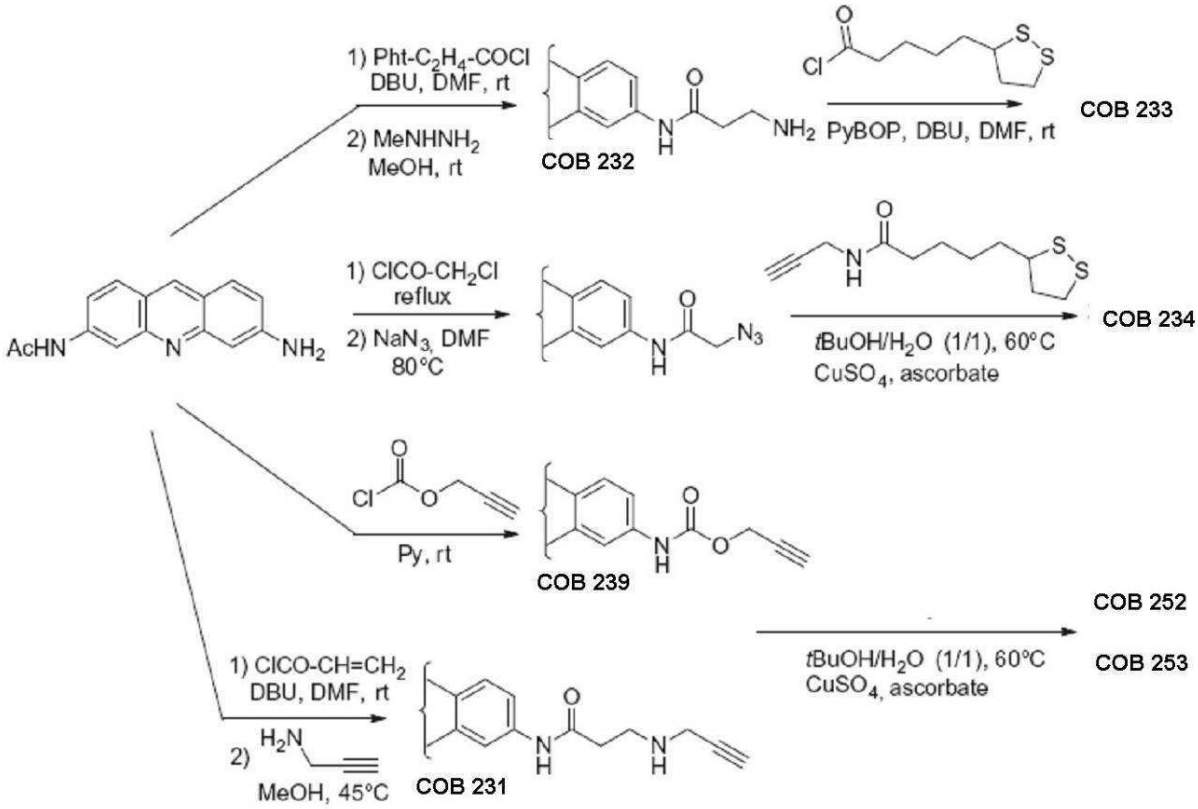


Figure 38: Voie de synthèse des composés fluorescents

4. Inhibition de la formation des fibres d'amyloïde *in vitro*

La capacité des composés COB à inhiber la formation des fibres d'amyloïde *in vitro* est mise en évidence grâce à un test utilisant la thioflavine T (ThT). Le suivi de la liaison de la ThT aux fibres d'amyloïde est une méthode répandue pour identifier les structures amyloïdes, suivre leur formation et leur désagrégation. Les composés sont ainsi co-incubés à une concentration de 10 µM avec de l'Aβ40 à une concentration de 50 µM et en présence de ThT. La fluorescence de chaque échantillon est mesurée 8 jours plus tard à une longueur d'onde de 485 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un échantillon contrôle contenant uniquement de l'Aβ40 et de la thioflavine.

5. Evaluation des COB sur cultures cellulaires

5.1. Culture primaire d'astrocytes

Les cellules mises en cultures sont des astrocytes de souris contrôles et 3xTgAD. Les cerveaux sont prélevés 4 jours après la naissance des animaux. La partie corticale est isolée et placée dans un milieu de culture sélectif DMEM Glutamax à 4,5 g/l de glucose (Dulbecco's

Modified Eagle Medium) avec 10% de sérum veau fœtal décomplémenté (SVF) et 1% de solution antibiotique (pénicilline 100 µg/ml et penistreptomycine 100 mg/ml). Les produits et milieux utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Invitrogen. La préparation est passée et écrasée à l'aide d'un piston de seringue de 1 ml sur un filtre minisart 40 µM (Falcon). La solution obtenue est complétée à 5 ml avec du milieu de culture et laisser 1h à l'étuve à 37°C, 5% CO_2 afin d'éliminer les débris tissulaires non désirés. Les cellules sont comptées sur une lame de Burker puis ensemencées à raison de 30000 cellules par puits sur des Lab-Tek (Brand products ; Nalge Nunc International 2000 North Nurora Road – Naperville IL 60563 USA). Les cellules sont maintenues 10 jours en culture à l'étuve à 37°C, 5% CO_2. Le milieu de culture est renouvelé quatre jours après l'ensemencement.

5.2. Culture primaire de neurones

Les cellules mises en culture sont des neurones de souris contrôles et 3xTgAD. Quatre jours avant l'expérience, les cerveaux sont prélevés chez le fœtus à 17 jours de gestation. Le sac vitellin est enlevé et déposé dans du PBS 1x. Les fœtus sont prélevés afin d'extraire les cerveaux. Le cortex est isolé sous loupe binoculaire en prenant soin d'enlever la pie mère. Les cortex sont placés dans une solution de DMEM, 1 g/l de glucose, trypsine 10% pendant 10 minutes au bain marie à 37°C. Trois rinçages successifs sont réalisés avec du DMEM, 1 g/l de glucose, SVF 10%. Le tissu est dilacéré par aspiration-reflux avec une pipette pasteur en verre. La préparation est passée sur un filtre de 70 µM puis centrifugée à 300g à 4°C pendant 5 minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est repris dans un milieu Neurobasal contenant 2% de facteur de croissance B27 auquel il a été ajouté 1% de L-Glutamine et 1% de pénistreptomycine. Le comptage et l'ensemencement des cellules sont réalisés de la même façon que pour la culture primaire d'astrocytes. Les cellules sont maintenues en culture à l'étuve à 37°C, 5% CO_2.

5.3. Culture de neuroblastomes

La culture de neuroblastomes est réalisée à partir de lignées tumorales d'origine commerciale stockées sous forme d'ampoules à une température de -196°C. Au sortir du conteneur d'azote, les échantillons sont rapidement décongelés dans un bain marie à 37°C. La suspension cellulaire est reprise dans 10 ml de milieu de culture DMEM GlutaMAX 4,5 g/l de glucose. La solution est centrifugée à 800 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé avant de resuspendre le culot cellulaire dans 1 ml de milieu de culture. Le comptage et

l'ensemencement des cellules sont réalisés de la même façon que pour la culture primaire d'astrocytes. Les cellules sont maintenues en culture à l'étuve à 37°C, 5% CO_2.

5.4. Incubation des molécules d'intérêt avec les cultures cellulaires

Les molécules d'intérêt sous forme lyophilisée sont resuspendues dans du DMEM à la concentration souhaitée (1, 10, 100 µM). Après avoir éliminé le milieu de culture des astrocytes et des neurones, les cellules sont mises à incuber à l'étuve durant 6 ou 24 heures avec l'une des solutions préparées. Après incubation, le milieu est éliminé et un rinçage est effectué afin de pouvoir effectuer des marquages histologiques.

5.5. Histologie

Différents marquages immunohistochimiques sont réalisés afin de caractériser les types cellulaires: NeuN (Millipore) et GFAP (DAKO).

Après avoir éliminé le milieu d'incubation, les cellules sont lavées (PBS 0,1M; 1x5 min) et fixées pendant 10 minutes dans une solution de paraformaldéhyde (PAF 4%, PBS 0,1M). Un nouveau lavage est effectué (PBS1x; 1x5min) avant de mettre les échantillons dans un bain de solution de saturation (BSA 4%, sérum fœtal de chèvre 10%, PBS 0,1M) pour une durée d'une heure. Cette étape est destinée à bloquer les sites de fixation non spécifiques par l'utilisation de BSA et de sérum issu de la même espèce animale que pour l'anticorps secondaire (dans le cas présent, il s'agit de la chèvre). Les échantillons sont ensuite mis à incuber sous agitation linéaire à 4°C pendant la nuit dans une solution contenant l'anticorps primaire, anti-GFAP: 1/10 000 pour marquer spécifiquement le cytosquelette des astrocytes et oligodendrocytes (DAKO) ou NeuN: 1/400 pour marquer spécifiquement les neurones de vertébrés (Millipore). Les anticorps sont dilués dans une solution de BSA 1%, Triton 0,3%, PBS 0,1M. Les cellules sont ensuite rincées (Triton 0,3%; PBS 0,1M; 1x5min) puis mises à incuber sous agitation linéaire à température ambiante pendant une heure dans une solution contenant l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin 1/1000 ou chèvre anti-souris 1/400, BSA 1%, Triton 0,3%; PBS 0,1M). Trois rinçages successifs sont réalisés (Triton 0,3%, PBS 0,1M; 3x5min). Les lames sont ensuite mises à incuber 10 minutes dans une solution de DAPI afin de réaliser le marquage des noyaux cellulaires en bleu (DAPI 100 nM, PBS 0,1 M) (DAPI, Roche Diagnostics, Allemagne). Un dernier rinçage de 5 minutes avec du PBS 0,1 M est effectué avant de monter les lames avec une lamelle à l'aide d'un liquide de montage en phase aqueuse compatible avec les analyses en milieu fluorescent (FluoPrep, Biomérieux).

5.6. Acquisition et analyse des images

Le signal fluorescent est observé grâce à un microscope à fluorescence Zeiss 5.1 (Zeiss) couplé à un appareil photographique numérique pour l'obtention des clichés. L'analyse des images est réalisée à l'aide du logiciel Axiovision 4.8 (Zeiss).

6. Evaluation de la liaison des COB sur coupes de cerveau

6.1. Préparation des coupes de cerveau de souris

Ce protocole est identique à celui décrit dans la partie II.I.A.3.1, page 90.

6.2. Préparation des coupes de cerveau humain

Les échantillons de tissu cérébral humain sont fournis par le laboratoire de physiopathologie de Genève (Division de Neuropsychiatrie de l'Hôpital de Chêne-Bourg, Hôpitaux Universitaire de Genève, Suisse) et par le laboratoire de physiopathologie de Lyon (Centre de Biologie et Pathologie Est (CBPE), Service de Biologie des Hôpitaux Civils de Lyon). Il s'agit de tissus congelés non fixés issus de prélèvements d'anatomopathologie chez des individus sains ou atteints de maladie d'Alzheimer présumée ou avérée. Les coupes sont réalisées selon le même protocole que décrit précédemment (partie II.I.A.3.1, page 90).

6.3. Incubation des molécules d'intérêt sur coupes de cerveau

Les molécules d'intérêt, conservées sous forme lyophilisées, sont diluées à la concentration souhaitée (1 à 390 µM) dans une solution de tampon Tris 0,05M à pH 7,4 et éthanol 0,5%.
Les coupes de cerveau sont réhydratées pendant 5 minutes dans un bain de tampon Tris 0,05M. Les lames sont ensuite placées à l'abri de la lumière dans un bain de solution contenant les molécules fluorescentes pendant 1 heure. Trois lavages successifs de 5 minutes chacun sont réalisés avec du tampon Tris. Les coupes sont ensuite fixées dans une solution de PAF à 4% pendant 20 minutes avant d'être rincées (Tris 0,05M; 3x5min). Un marquage des noyaux cellulaires est effectué en immergeant les coupes pendant 10 minutes dans une solution de DAPI à 300 nM. Les lames sont rincées avec du liquide physiologique puis brièvement trempées dans l'eau avant montage entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage en phase aqueuse comportant des conservateurs pour la fluorescence (Fluorescent mounting medium, Dako, USA). Les lames sont conservées à l'abri de la lumière à 4°C afin de conserver l'intensité du signal fluorescent.

6.4. Incubation avec la solution contrôle de thioflavine

La thioflavine S (Sigma, USA) conservée sous forme lyophilisée est diluée à une concentration de 390 µM dans une solution de tampon PBS 1x.

Les coupes de cerveau sont réhydratées pendant 5 minutes dans du PBS 1x puis fixées dans un bain de paraformaldéhyde à 4% pendant 20 minutes. Après lavage (PBS 1x; 3x5min), les coupes sont placées pendant 5 minutes dans une solution de PBS 1x / permanganate 0,125% (0,25% pour les coupes humaines) (Fluka Biochemica, République Tchèque). Les coupes sont ensuite immergées dans une solution de PBS 1x / bisulfite de potassium (10 g/l) / acide oxalique (10 g/l) (Sigma Aldrich, USA). Une fois les coupes devenues blanches, elles sont incubées 5 minutes dans une solution PBS 1x / Ethanol 40% / Thioflavine S 0,125 g/l. La thioflavine est dissoute préalablement dans le PBS avant d'ajouter l'éthanol. Les coupes sont ensuite rincées dans un bain de PBS1x / Ethanol 40% pendant 5 minutes puis dans un bain de PBS 1x. Les lames sont rincées avec du liquide physiologique puis brièvement rincées dans l'eau avant montage entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage en phase aqueuse comportant des conservateurs pour la fluorescence (Fluorescent Mounting medium, Dako, USA). Les lames sont conservées à l'abri de la lumière à 4°C afin de conserver l'intensité du signal fluorescent.

6.5. Acquisition et analyse des images

Les coupes sont analysées au moyen d'un microscope à fluorescence Leitz Akioskop 2+ équipé des filtres suivants: (1) excitation BP546/12, Beam Splitter FT 580, émission LP 590 (Rhodamine); (2) excitation BP470/40, Beam Splitter FT 495, émission BP525/50 (FITC); (3) excitation G365, Beam Splitter FT 395, émission BP 445,450 (DAPI). Ce microscope est couplé à un appareil photographique afin de réaliser des clichés.

7. Evaluation biologique des COB *in vivo*

7.1. Administration des composés

Les molécules d'intérêt conservées sous forme lyophilisées sont resuspendues à la concentration souhaitée dans une solution de NaCl 0,9% et d'éthanol 0,5%. L'injection du traceur est réalisée dans l'une des deux veines caudales de la souris à raison de 20 mg/kg soit environ 0,5 mg/150 µl de solution.

7.2. Préparation des coupes de cerveau de souris

Quatre heures après injection, l'animal est euthanasié. Le cerveau est prélevé et les coupes réalisées suivant le même protocole que décrit précédemment (partie II.I.A.3.1, page 90). Les lames sont réhydratées dans une solution de NaCl 0,9% puis immergées 10 minutes dans une solution de DAPI à 300 nM afin d'assurer le marquage des noyaux en fluorescence bleue. Les lames sont rincées avec du liquide physiologique puis brièvement rincées dans l'eau avant montage entre lame et lamelle.

7.3. Acquisition et analyse des images

L'évaluation de la fixation du traceur dans le tissu cérébral se fait par visualisation du signal fluorescent en vert sur les coupes de cerveau à l'aide d'un microscope à fluorescence dans les mêmes conditions que décrites précédemment (Partie III.II.6.5, page 122).

B. Résultats

1.1. Inhibition de la formation des fibres d'Aβ40 *in vitro*

La capacité d'inhibition des COB à inhiber la formation des fibres amyloïdes en solution *in vitro* est présentée sur la figure 39.

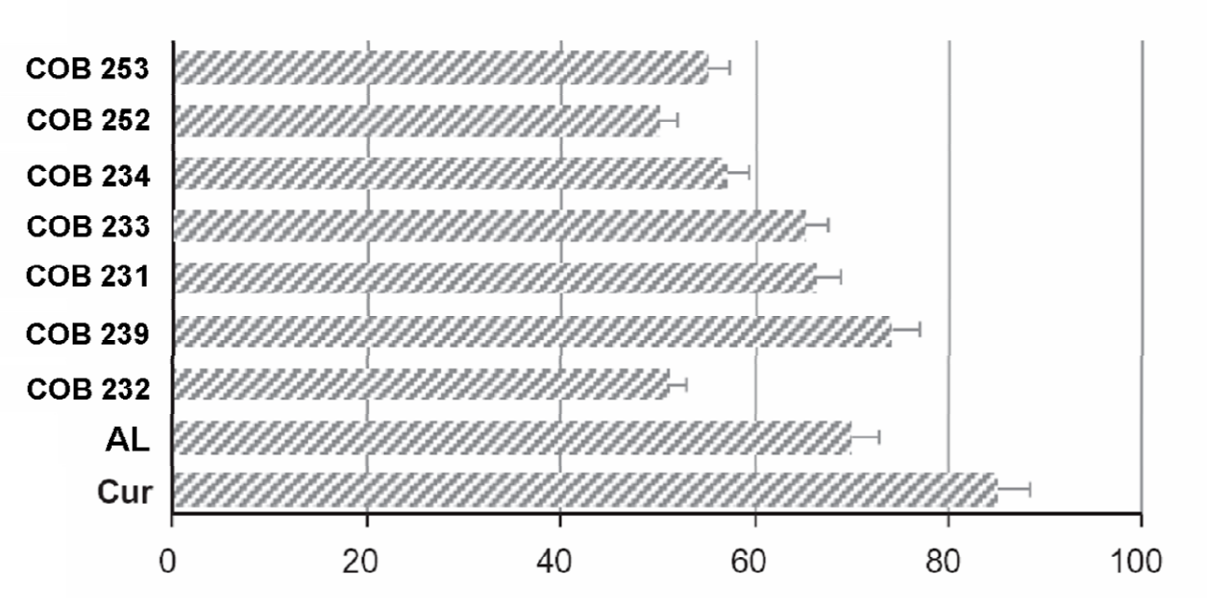


Figure 39: Inhibition de la formation des fibres d'Aβ40 *in vitro*.

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de la formation des fibres amyloïdes par rapport à un échantillon contrôle sans molécules d'intérêt. Les COB sont mis en solution à 10µM. AL: acide lipoïque, Cur: curcumine.

Les dérivés de proflavine évalués présentent des capacités d'inhibition de formation des fibres amyloïdes allant de 51 à 74% à 10 µM (Figure 39). Parmi ceux-ci, le composé COB 239 présente le taux d'inhibition le plus fort. La curcumine et l'acide lipoïque, utilisés en tant qu'inhibiteurs de référence présentent des propriétés inhibitrices importantes avec des taux d'inhibition respectifs de 84% et 69% à 10 µM. La curcumine exerce une activité inhibitrice plus importante que tous les dérivés évalués. En revanche, le composé COB 239 présente des capacités d'inhibition plus élevées que l'acide lipoïque (74% contre 69%). L'ajout de la base Tröger ou de la partie lipoïque sur le composé proflavine initial n'apporte pas de bénéfice supplémentaire (55 à 65% d'inhibition environ). Ces deux éléments, la base Tröger et la partie lipoïque, évalués seuls sans proflavine s'avèrent même incapables d'inhiber la formation des fibres d'Aβ40 *in vitro*. Enfin, en ce qui concerne le pouvoir de déstabilisation des COB sur des fibres amyloïdes déjà formées, aucun composé COB évalué n'a eu d'effet désagrégant.

1.2. Liaison des COB sur coupes de cerveau de souris

La capacité des COB à se lier aux dépôts β-amyloïdes a été évaluée sur coupes de cerveau de souris 3xTgAD et sur coupes de cerveau issues de l'anatomopathologie humaine. Les résultats sont indiqués sur la figure 40 et le tableau 12.

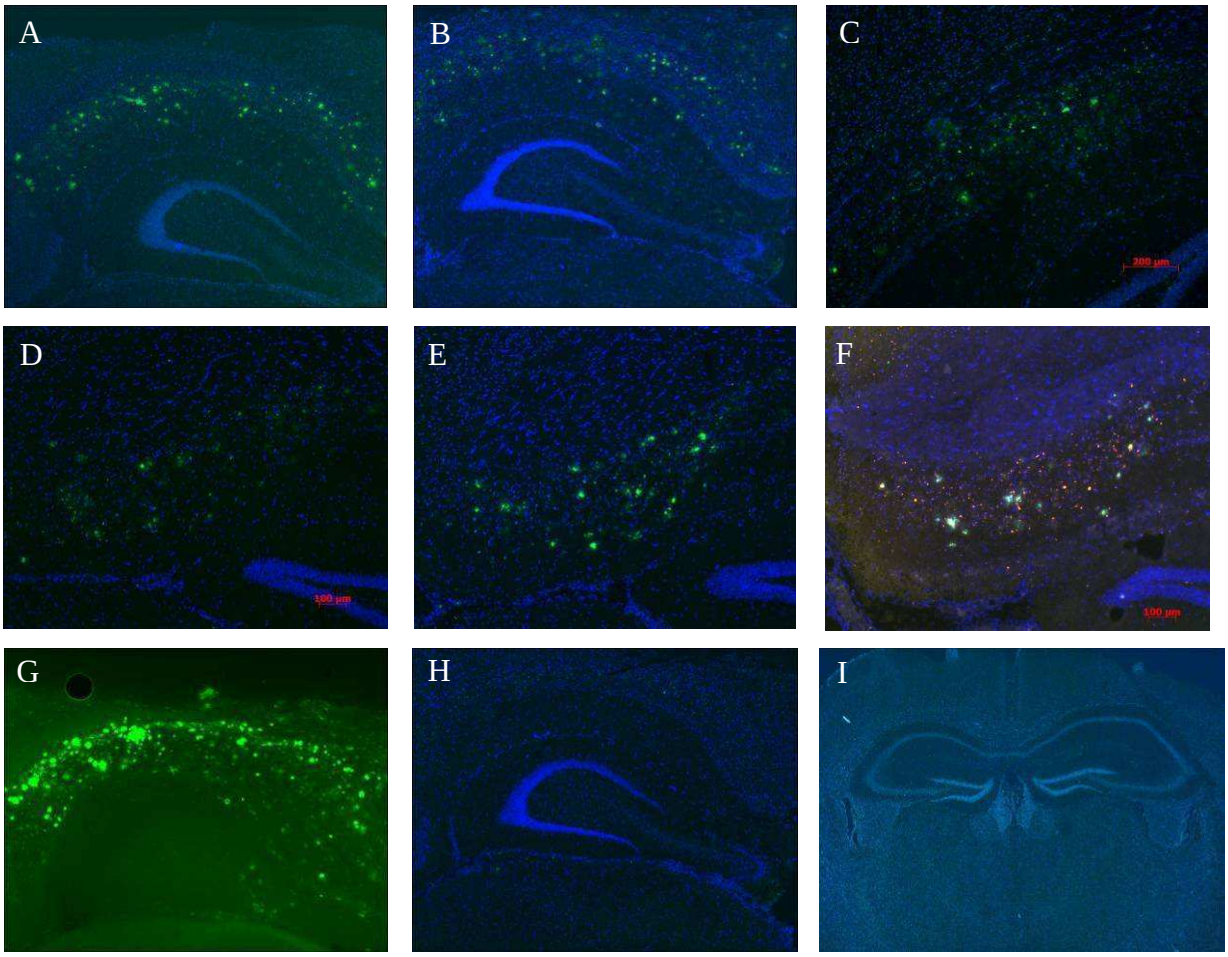


Figure 40: Liaison des dérivés proflavines sur coupes de cerveau de souris

Exemples de photographies de coupes de cerveau de souris WT (I) et 3xTgAD (A à H) après binding *ex vivo* des différents dérivés de proflavine. Les composés COB et la thioflavine fluorescent en vert. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu. Les COB sont utilisés à une concentration de 100 µM et la thioflavine à 390 µM. Tous les clichés sont réalisés dans la région hippocampique. A: COB 231; B: COB 231_{dim}; C: COB 239; D: COB252; E: COB 253; F: IMPY; G: Thioflavine S; H: condition contrôle: Souris 3xTgAD sans liaison; I: condition contrôle: COB231 sur souris WT.

Tous les dérivés de proflavine évalués présentent une fixation importante sur les coupes de cerveau de souris 3xTgAD. Les marquages obtenus sont typiques de la morphologie des plaques amyloïdes et leur distribution est corrélée de manière significative avec la distribution des PA mise en évidence par marquage à la thioflavine S (Figure 40). Les COB 231 et 231_{dim} présentent les meilleurs résultats. La thioflavine S et le IMPY fluorescent sont utilisés en tant que contrôles positifs pour le marquage de plaques. Les COB 231 et COB 231_{dim} se montrent plus efficaces que le IMPY pour la détection des PA. La thioflavine S présente de meilleurs résultats que les COB à des concentrations identiques (Figure 40).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de marquage des dépôts amyloïdes sur les coupes de tissus humains de patients atteints de la MA à l'aide des dérivés de proflavine (données non présentées). Les coupes de cerveau humain à notre disposition présentaient pourtant bien des dépôts amyloïdes mis en évidence par marquage à la thioflavine S.

Composé évalué	Coupes de souris 3xTgAD	Coupes humaines
COB 231	++	-
COB 231_{dim}	++	-
COB 232	+	-
COB 233	+	-
COB 234	+	-
COB 239	+	-
COB 252	+	-
COB 253	+	-
IMPY	+	-
Thioflavine	+++	+++

Tableau 12 : Récapitulatif des résultats de liaison des COB sur coupes de cerveau

Huit composés COB ont été évalués. Ils détectent tous les PA sur coupes de tissu cérébral de souris 3xTgAD. COB 231 et COB 231_{dim} sont les composés qui ont les meilleurs résultats. Contrairement à la thioflavine S, les COB ne permettent de mettre en les PA sur les coupes de tissus humains.

1.3. Evaluation biologique des COB *in vivo*

Les résultats de l'évaluation biologique des COB *in vivo* sont indiqués dans la figure 41.

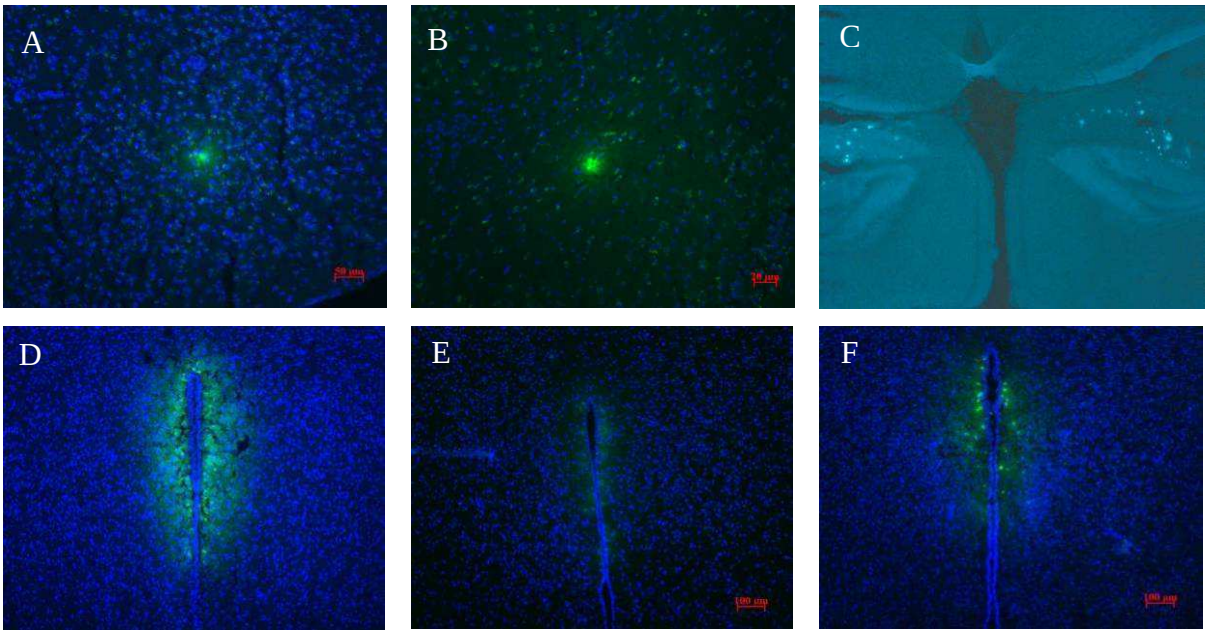


Figure 41: Coupes de cerveau de souris transgéniques après administration des COB *in vivo*.

Exemples de photographies de coupes de cerveau de souris WT (F) et 3xTgAD (A à E). Les clichés sont réalisés dans la région hippocampique (A, B, C) ou au niveau du troisième ventricule (D, E, F). A: COB 231; B: COB 231_{dim}; C: Marquage à la thioflavine *post mortem* sur coupes de cerveau; D: COB 231; E: condition contrôle: Souris 3xTgAD non injectée; F: condition contrôle: souris contrôle WT injectée avec COB 231.

Les résultats mettent en évidence de nombreuses plaques amyloïdes marquées en vert au niveau de l'hippocampe (Figure 41 A, B, C). Le signal observé est bien spécifique des régions riches en PA mises en évidence par marquage à la thioflavine S sur des souris 3xTgAD du même âge. On ne note pas de signal aspécifique en dehors des dépôts amyloïdes hormis dans les régions péri-ventriculaires (Figure 41-D). Ce marquage visible dans les régions péri-ventriculaires indique une diffusion importante des composés entre le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral. Les souris 3xTgAD n'ayant pas été injectées avec les composés d'intérêt ne présentent pas de signal fluorescent vert (Figure 41-E). Les souris contrôles ayant été injectées avec les molécules d'intérêt ne présentent pas de signal fluorescent vert dans l'hippocampe. En revanche, chez ces souris, on observe également un marquage péri-ventriculaire signe d'une diffusion du produit entre le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral (Figure 41-F).

1.4. Expériences réalisées en culture cellulaire

Les résultats des expériences de cultures cellulaires sont présentés sur la figure 42.

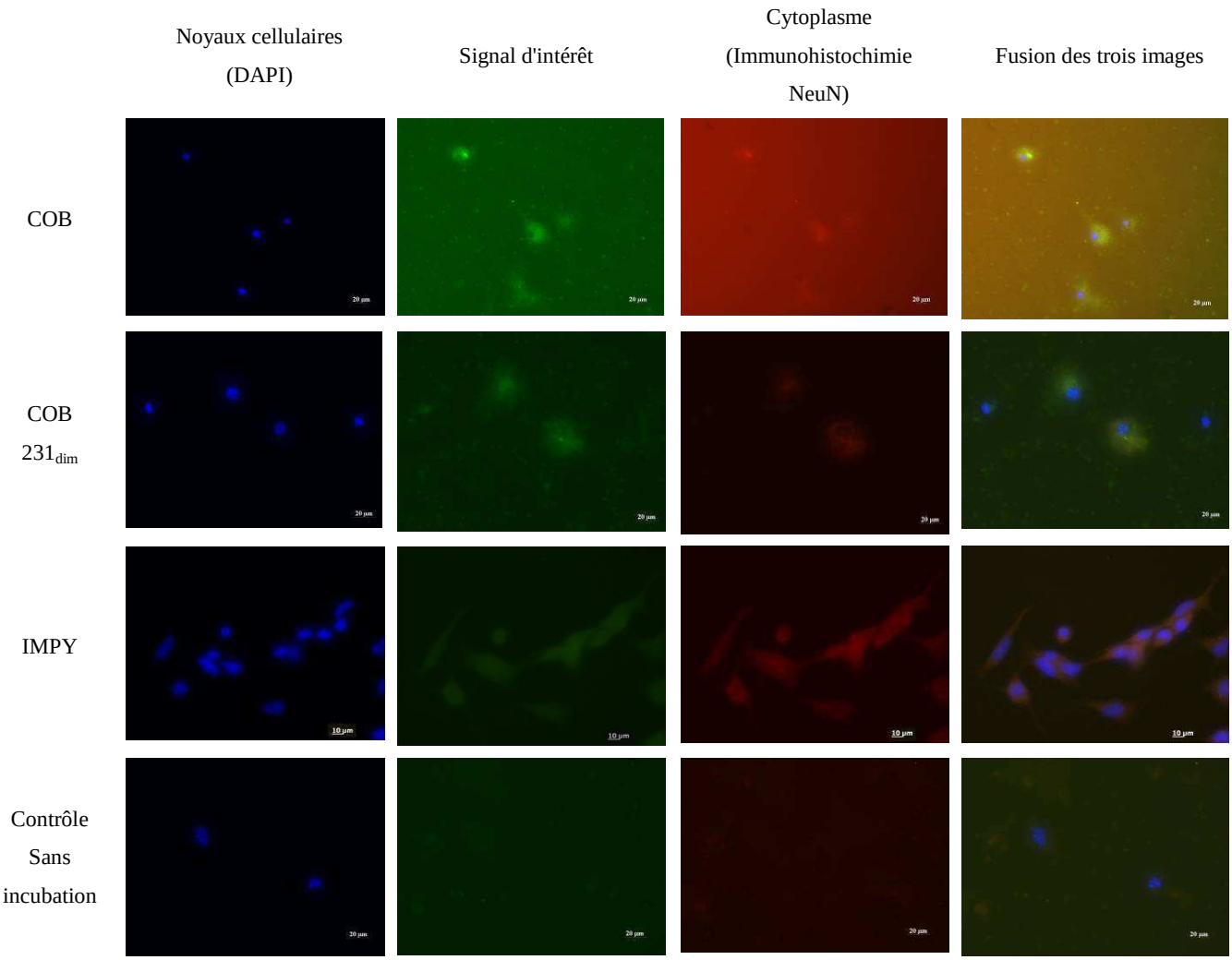


Figure 42: Exemple de photos de cultures cellulaires de neurones après incubation avec COB 231, COB 231_{dim} ou IMPY

Les clichés sont réalisés après incubation de COB 231, COB 231_{dim} ou de IMPY dans le milieu de culture primaire de neurones issus de souris Wild-Type.

Les propriétés des COB *in vitro* ont été évaluées sur des cultures primaires de neurones de souris WT ou transgéniques 3xTgAD et sur des cultures de neuroblastomes (Figures 42 et 43). Après incubation des composés COB 231, COB 231_{dim} et IMPY pendant 6 ou 24 heures la fluorescence verte est détectée grâce à un microscope à fluorescence. Une contre-coloration est effectuée pour mettre en évidence les noyaux cellulaires (signal en bleu) (Figure 42).

Dans toutes les conditions évaluées, le signal en vert issu des composés testés est clairement mis en évidence à l'intérieur des cellules. Ce marquage vert, observé dans l'espace

intracellulaire, n'est pas retrouvé dans les cellules qui n'ont pas été incubées avec les molécules d'intérêt. Les signaux vert et bleu s'excluent mutuellement, signe que les composés ne pénètrent pas dans le noyau des cellules. Une coloration du cytoplasme par immuno-histochimie a été réalisée sur certains échantillons. Cette coloration (en rouge sur la figure 42) est bien co-localisée avec le signal vert. Ces différentes observations attestent de la pénétration des COB 231, COB 231_{dim} et IMPY dans les neurones en cultures et de leur localisation cytoplasmique.

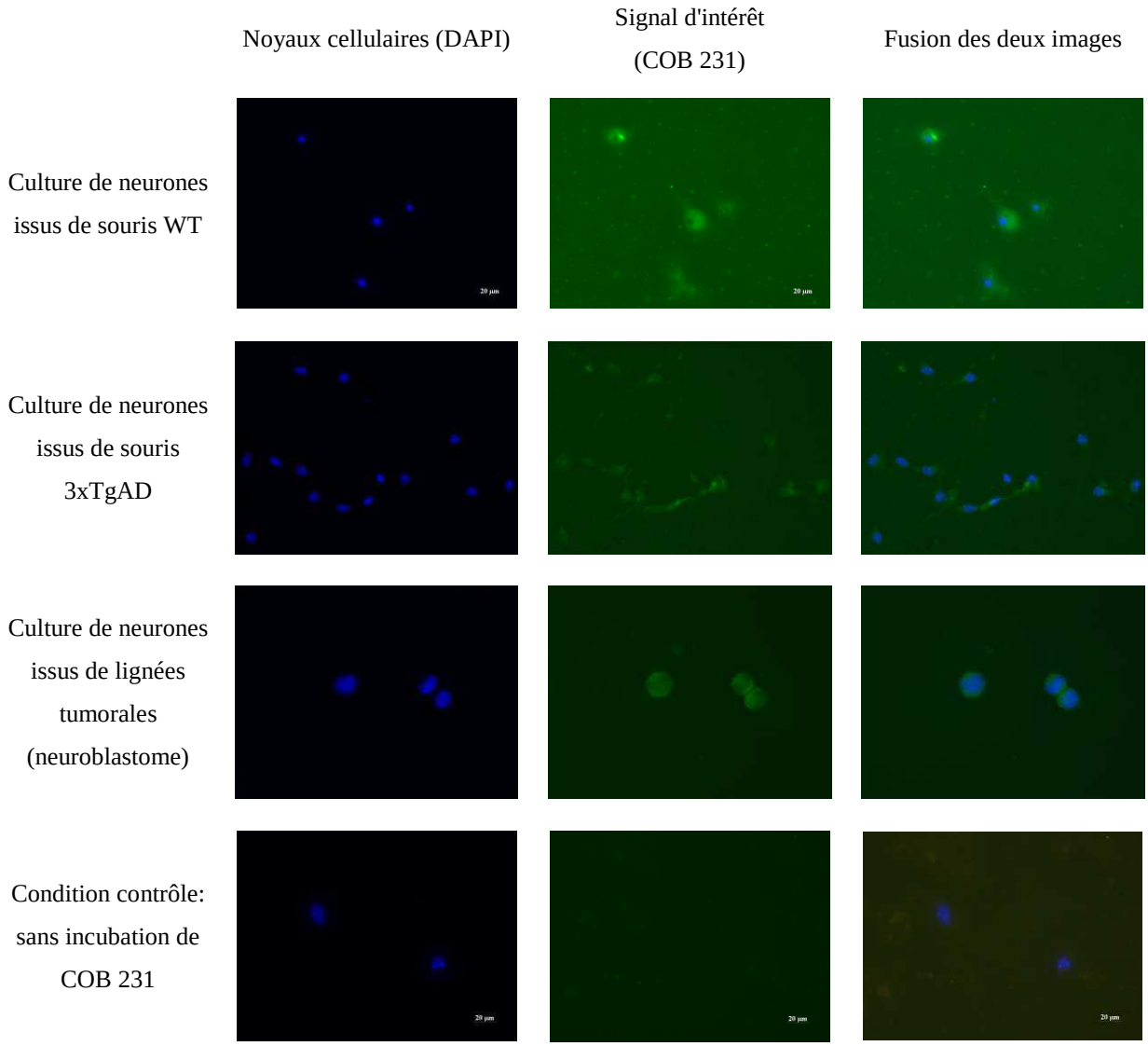


Figure 43: Exemples de photos de cellules en culture après incubation avec COB 231.
Les noyaux cellulaires sont visualisés en bleu grâce à un marquage au DAPI. Le signal en fluorescence verte indique la présence des composés d'intérêt. Les clichés présentés ont été réalisés après incubation de COB 231 pendant 6 heures dans le milieu de culture des neurones.

Il n'y a pas de différence d'intensité du signal entre les cellules provenant de souris WT ou 3xTgAD (Figure 43). Le fait que les cellules proviennent de la lignée transgénique n'induit donc pas de modification de la pénétration des composés dans les conditions testées. Les résultats concernant les lignées cellulaires de neuroblastomes humains sont identiques à ceux mis en évidence pour les cultures de cellules murines.

A conditions équivalentes, les trois composés évalués présentent des résultats similaires (Figure 42).

Différents paramètres ont également été mesurés comme la toxicité des composés, l'influence de la durée d'incubation ou encore l'influence de concentrations croissantes de composés sur les cellules en culture. La durée d'incubation n'influe pas de manière significative sur l'intensité du signal (évaluée entre 6 et 24 heures d'incubation). L'utilisation de différentes concentrations de COB 231, COB 231_{dim} et IMPY n'a pas permis de mettre en évidence de variations dans l'intensité du signal mesuré. La toxicité des molécules sur les cultures cellulaires, évaluée de façon qualitative, est très limitée. Aucune différence notable n'a pu être mise en évidence concernant le nombre de cellules observées.

C. Discussion

Les COB sont des aminoacridines naturellement fluorescentes ayant la capacité d'interagir avec les fibres d'amyloïdes *in vitro*. L'ajout d'analogues de base Tröger ou d'acide lipoïque sur une aminoacridine initiale a permis de synthétiser un ensemble de 8 composés. Ces modifications ont été réalisées dans le but d'augmenter l'interaction avec les fibres amyloïdes. L'acide lipoïdique est un antioxydant décrit comme inhibiteur de la formation des fibres amyloïdes (Ono 2006), et les analogues de base Tröger présentent une forme concave qui leur permettrait d'interagir avec les boucles formées par les feuillets β des fibres amyloïdes. La capacité des différents composés synthétisés à inhiber la formation des fibres amyloïdes *in vitro* varie de 54 à 74%. Comparés à deux composés de référence (la curcumine et l'acide lipoïque), les COB présentent des propriétés globalement plus faibles (entre 50 et 65% d'inhibition pour la plupart des COB, contre 70 à 80% pour les références). Seul le COB 239 présente de meilleurs résultats que l'acide lipoïque (74% contre 69% respectivement). La curcumine reste le meilleur inhibiteur de formation des fibres par rapport à tous les composés évalués. L'acide lipoïque et la curcumine peuvent désagréger des fibres amyloïdes déjà formées *in vitro* (Ono 2006). Le fait que les COB puissent inhiber la formation des fibres *in vitro* montre clairement qu'il existe une forme d'interaction entre les COB et les peptides d'Aβ40 *in vitro*.

L'incubation de nos composés avec des fibres amyloïdes d'Aβ40 préformées n'induit pas de désagrégation des structures existantes. Dans des conditions d'évaluation proches, la curcurmine et l'acide lipoïque peuvent désagréger respectivement jusqu'à 90 et 60% des fibres amyloïdes préformés. L'absence de telles propriétés n'est cependant pas nécessairement un problème si l'on considère que ces composés doivent servir de moyen de détection des dépôts amyloïdes. Dans cette optique, l'absence de toute modification de la quantité de dépôts amyloïdes par le traceur permettra de réaliser un examen plus précis et sans conséquence sur le tissu étudié.
L'ajout d'analogues de base Tröger et d'acide lipoïque sur l'aminoacridine initiale ne permet pas d'augmenter les propriétés d'inhibition de formation des fibres. Utilisés seuls, sans aminoacridine, ces analogues ne présentent aucune capacité d'inhibition indiquant clairement l'importance de la partie aminoacridine dans ce processus.

La toxicité et la capacité des COB à pénétrer à l'intérieur des neurones ont été évaluées sur des cultures de neuroblastomes et des cultures primaires de neurones issus de souris WT ou 3xTgAD. Etant donné que le COB 231 et le COB 231_{dim} présentaient les meilleurs résultats pour l'imagerie des PA, nous avons décidé de réaliser cette évaluation avec ces deux composés uniquement. Comme pour les études précédentes, le IMPY fluorescent a été utilisé en tant que référence. Les COB ne présentent pas de toxicité prononcée que ce soit après 6 ou 24 heures d'incubation sur cultures cellulaires de neurones. Au contraire, il semble même que les composés utilisés aient stimulé ou protégé les cellules en culture dans la condition à 24 heures par rapport aux contrôles sans incubation. Ce résultat reste cependant à confirmer sur un nombre plus important d'expériences. De la même façon, il n'y a pas d'effet de dose sur la toxicité cellulaire dans la gamme de concentrations évaluées (1 à 100 µM). Le COB 231 et le COB 231_{dim} pénètrent à l'intérieur des neurones en culture. Les composés se retrouvent dans le cytoplasme des cellules. Il n'y a pas d'effet de dose ni de temps sur la pénétration cellulaire des COB. Le IMPY présente des résultats identiques à ceux décrits pour les COB. L'étude de la pénétration des COB sur cultures d'astrocytes est en cours et permettra de déterminer si cette internalisation est spécifique d'un type cellulaire particulier. Le mécanisme d'entrée de ces composés à l'intérieur des neurones reste encore à établir.

Afin de poursuivre la caractérisation des COB, nous avons évalué leur capacité à se lier aux dépôts amyloïdes sur des coupes de tissu cérébral de souris. Les COB se fixent en quantité importante dans les régions cérébrales riches en plaques amyloïdes (hippocampe et amygdale

notamment). L'observation de ces régions à plus fort grossissement indique un marquage de dépôts extracellulaires visuellement très similaires à ceux mis en évidence par un marquage à la thioflavine. De plus, en l'absence de PA (chez la souris WT ou dans la région du cervelet chez les souris 3xTgAD par exemple), aucun signal fluorescent provenant des COB n'a été observé. Le marquage des PA à l'aide d'un marqueur fluorescent de référence des PA, le IMPY, utilisé dans les mêmes conditions, est superposable avec le marquage des COB. Ces résultats indiquent que les COB se lient de façon spécifique aux lésions β-amyloïdes. Tous les COB évalués présentent des marquages de bonnes qualités des PA et globalement assez proches. Cependant, deux composés ont démontré de meilleurs résultats que les autres pour l'imagerie fluorescente des PA: le COB 231 et le COB 231_{dim}. L'analyse qualitative des coupes de cerveau de souris 3xTgAD indique en effet un signal légèrement plus intense et un nombre plus élevé de dépôts amyloïdes marqués pour ces deux molécules. L'incubation des COB sur coupes de tissu cérébral humain n'a pas permis de mettre en évidence de marquage des PA. Une différence entre les PA murines et humaines ou une différence dans le protocole de conservation des tissus cérébraux pourrait être à l'origine de l'absence de fixation des COB.
Le marquage des PA par la thioflavine S est plus intense que celui des COB. Cependant, la thioflavine ne peut être utilisée *in vivo* car elle ne franchit pas la BHE. L'administration de COB 231 et COB 231_{dim} à des souris 3xTgAD montre que ces composés sont capables de franchir la BHE. De plus, les COB conservent leurs propriétés de marquage des PA *in vivo*. Comme précédemment avec les expériences de liaison sur coupes, le signal fluorescent vert issu des COB est présent dans les régions riches en PA et la morphologie des dépôts extracellulaires marqués est conforme à l'origine amyloïde de ces lésions. *In vivo*, les COB sont également retrouvés en grande quantité dans les régions périventriculaires chez les souris 3xTgAD et WT, ce qui indique une diffusion de ces composés entre le liquide céphalo-rachidien et le tissu cérébral environnant.
Ces résultats sont comparables à ceux décrits par Suemoto *et al.* concernant une amino-acridine (BF-108) utilisée en tant que traceur des PA (Suemoto 2004). BF-108 et les COB marquent les dépôts extracellulaires de peptide amyloïde chez la souris transgénique par liaison sur coupes de tissu mais également *in vivo* quatre heures après administration des composés. Contrairement à BF-108, les COB sont spécifiques des PA seules et non des DNF.
Contrairement à la thioflavine S, les COB ne permettent pas de détecter les PA sur coupes de tissu cérébral humain. Cette absence de signal pourrait être due à une méthode de fixation non adaptée du tissu. En effet, suivant la méthode de conservation du tissu (tissu congelé, tissu fixé dans le paraformaldhéhyde, tissu paraffiné), il est possible que l'accès à la cible ou que la

conformation de la cible elle-même soit modifiée et limite la reconnaissance du traceur avec sa cible. Nous avons évalué différentes techniques de fixation tissulaire jusqu'à présent sans plus de succès. Il est possible que le traceur COB puisse reconnaître les PA sur tissu humain après un marquage radioactif. C'est par exemple le cas du IMPY. Non marqué, le IMPY fluorescent ne permet pas de mettre en évidence les PA sur coupes de cerveau humain mais fonctionne très bien sur coupes de cerveau de souris 3xTgAD. Une fois radiomarqué, le ^{123}I-IMPY est capable de mettre en évidence la présence de PA dans le cerveau de patients atteints de la MA (Kung 2004a). La possibilité de voir les COB détecter les PA sur le tissu humain reste donc à explorer.

Le radiomarquage des COB pourra être envisagé à moyen terme notamment afin de résoudre le problème de détection des PA dans le tissu humain. La compétitivité du marché des traceurs des PA est cependant très importante. Trois nouveaux radiotraceurs des PA devraient être disponibles prochainement (voir revue bibliographie chapitre C.3.2.2.1.1, page 63). L'avenir des COB en tant que radiotraceur clinique des COB est donc limité. Cependant, ce traceur reste tout à fait adapté à une utilisation pour les études pré-cliniques notamment grâce à la possibilité de réaliser de l'imagerie fluorescente et de l'imagerie nucléaire. De plus, la possibilité d'utiliser ces composés en tant que vecteur pour des molécules d'intérêt thérapeutique visant les PA sera à prendre en considération.

D. Conclusion

Les COB ont montré une bonne capacité d'interaction avec les fibres amyloïdes que ce soit *in vitro* en solution ou *in vivo* dans le tissu cérébral de souris 3xTgAD. La toxicité de ces composés sur culture cellulaire est nulle et nous avons montré leur capacité à pénétrer à l'intérieur des neurones en culture et à s'accumuler dans le cytoplasme. Enfin, la détection des PA en microscopie de fluorescence sur coupes de cerveau de souris 3xTgAD ayant reçues une injection de COB a été validée. La détection des lésions amyloïdes sur coupes de tissu humain reste à démontrer et sera potentiellement mise en lumière par un marquage radioactif. Compte tenu de la forte compétitivité sur le marché des radiotraceurs des PA en clinique, les perspectives de ces molécules sont essentiellement tournés vers la recherche pré-clinique et la vectorisation de molécules à destination des PA.

III. Evaluation biologique d'un ligand de la protéine Tau : A93

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) représentent l'une des deux principales lésions caractéristiques de la MA. Leur distribution et leur cinétique d'apparition dans le cerveau correspondent aux symptômes cliniques de la MA. Il n'existe pas aujourd'hui de radiotraceur efficace des DNF *in vivo*. Le développement d'un tel radiotraceur est nécessaire afin de mieux appréhender les aspects dynamiques relatifs à ces lésions. C'est pourquoi nous avons initié le développement d'un peptide radiomarqué (A93) permettant le suivi des DNF *in vivo* en imagerie nucléaire. A93 est une séquence peptidique de 7 acides aminés destinée à reconnaître et à se fixer sur les dégénérescences neurofibrillaires. La synthèse de cette molécule est réalisée par l'équipe du Dr Julian Garcia du Département de Chimie Moléculaire (DCM) dirigé par le Pr Pascal Dumy. Pour des raisons de confidentialité, la séquence et le mécanisme possible d'interaction de A93 avec les DNF ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

A. Matériels et méthodes

1. Radiochimie

1.1. Principe de la complexation histidine-cœur tricarbonyle

Le protocole de radiomarquage utilisé pour le marquage des deux vecteurs, C6 et C3, fait intervenir un complexe ^{99m}Tc-tricarbonyle (Figure 44). Il s'agit d'un petit complexe-Tc capable de se complexer à un grand nombre de ligands. Des études ont démontré la capacité de ce coeur tricarbonyle à lier les résidus histidine dans les protéines et les peptides. Il a également été montré que l'histidine est le meilleur ligand et que sa position en N-terminal est la plus favorable pour le radiomarquage. L'histidine peut être incorporée dans des peptides obtenus par synthèse afin de faciliter le radiomarquage avec le cœur Tc-tricarbonyle ([^{99m}Tc-$(H_2O)_3(CO)_3$]+). Le kit Isolink® (Mallinckrot, St Louis, MO) est utilisé pour la formation de ce cœur Tc-tricarbonyle. Ce précurseur échange ensuite rapidement ses molécules d'eau avec une grande variété de ligands donneurs, notamment l'histidine. Les sites potentiels de coordination du ^{99m}Tc sont l'azote présent dans le cycle de l'imidazole, le groupement amine en N-terminal et également le groupement NH amide de la liaison peptidique (Figure 44). La pureté radiochimique est déterminée par radio-Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

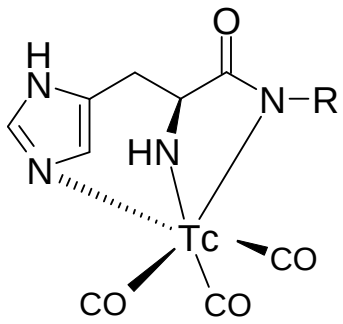


Figure 44: Principe de radiomarquage via le complexe tricarbonyle
Complexation du résidu histidine par le complexe carbonyle technétié [^{99m}Tc$(H_2O)_3(CO)_3$]+ ; préparation à partir du kit Isolink® (Mallinckrodt).

1.2. Protocole de radiomarquage

Le marquage s'effectue en 2 étapes :

- dans une première étape, le précurseur tricarbonyle est préparé. Pour cela, on ajoute au kit commercial Isolink® (Mallinckrodt) entre 2200 et 3700 MBq (60-100 mCi) d'un éluat frais de pertechnétate de sodium issu d'un générateur ^{99}Mo/^{99m}Tc. Le volume final est de 1 ml. La solution est chauffée à 95°C pendant 20 minutes dans un bloc chauffant. Le chélate ([^{99m}Tc-$(H_2O)_3(CO)_3$]+) formé est stable. La solution très basique est neutralisée à pH 7-8 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (1N, 130 µl).
- dans une seconde étape, on ajoute le ligand peptidique. Il se produit une réaction d'échange de ligands. Il y a substitution entre les molécules d'eau du synthon et les atomes donneurs (azote du ligand peptidique). Les conditions de réaction telles que durée, température, pH, activité spécifique, et concentration du peptide doivent être déterminées pour chaque molécule étudiée. Aussi, 518 - 666 MBq de précurseur [^{99m}Tc $(CO)_3(H_2O)_3$]+ sont ajoutés à 100 µg de produit. Après avoir ajusté le volume final à 600 µl, le mélange est incubé à 70°C pendant 20 min pour le peptide linéaire (A93). Après refroidissement, la pureté radiochimique (PRC) est déterminée par radio-CLHP en utilisant une colonne C18.

1.3. Analyse de la pureté radiochimique

La pureté radiochimique (PRC) des différentes molécules marquées est analysée par CLHP en phase inverse équipée d'un radiodétecteur (γ-RAM Model 4, LabLogic). Chaque traceur est élué sur une colonne de silice greffée C18 (RP-18 Lichrosorb, Supelco, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Un gradient d'élution est constitué par 2 éluants A et B, à un débit de 1 ml/min. L'éluant A est de l'eau contenant 0,1% de TFA (acide trifluoroacétique) et l'éluant B est un mélange acétonitrile-eau (90 : 10 ; v/v) contenant 0,1% de TFA. Le gradient d'élution commence avec 5% B (95% A) de 0 à 5 min, suivi par une augmentation linéaire du pourcentage de B pour atteindre 80% à 20 minutes. Le système retourne aux conditions initiales en 10 minutes.

1.4. Analyse de la stabilité du peptide A93 *in vivo* chez la souris

Pour les études de stabilité *in vivo*, le traceur technétié est injecté aux souris et analysé aux différents temps choisis (5, 10, 45 minutes) post-injection en prélevant le sang (Figure 45).

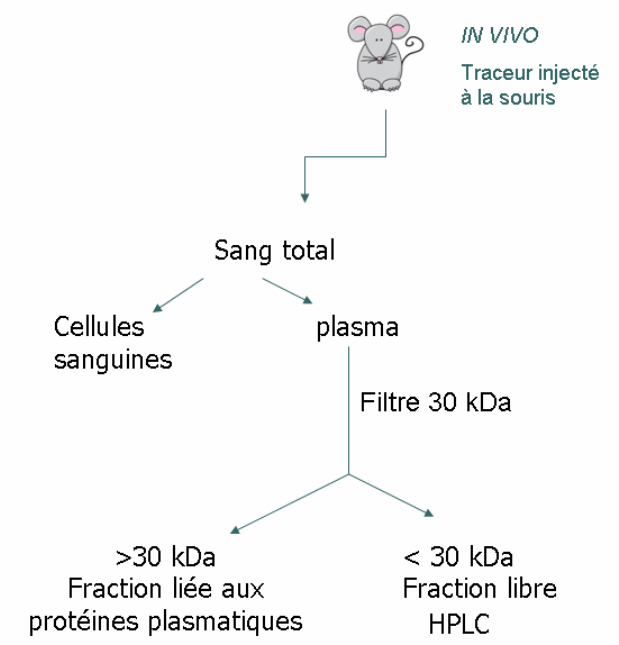


Figure 45: Protocole pour l'analyse de stabilité de A93 dans le sang de souris

Une première centrifugation 3 minutes à 3000 g permet de séparer le plasma (surnageant) des globules rouges. L'activité est mesurée dans chaque fraction afin d'évaluer la proportion de traceur liée aux cellules sanguines.

Le surnageant (plasma) est ensuite déposé sur une membrane filtrante (NanoSep® 30K oméga™ Pall Life sciences) et rapidement centrifugé 15 minutes à 13 000 rpm afin d'éliminer les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 30 kDa. L'activité est à nouveau mesurée dans chaque fraction afin d'évaluer la proportion de traceur circulant et de déterminer la fixation du traceur aux différentes protéines plasmatiques. En effet, l'activité restante sur le filtre correspond à la fraction liée aux différentes protéines plasmatiques supérieures à 30 kDa. L'activité mesurée dans le filtrat correspond à la fraction libre.

La stabilité du traceur est alors appréciée en analysant le filtrat par radio-CLHP dans les conditions habituelles.

2. Evaluation de la liaison de A93 sur coupes de cerveau

2.1. Préparation des coupes

Des coupes de souris 3xTgAD et WT sont préparées selon le même protocole que décrit précédemment dans la partie II.I.A.3.1, page 90.

2.2. Incubation

Les coupes sont réhydratées 5 minutes dans un bain de tampon Tris 0,05M. Les molécules sont diluées à la concentration souhaitée dans du tampon Tris puis sont mises directement à incuber sur les coupes de cerveau durant une heure. Les coupes sont ensuite rincées (tampon Tris; 3x5min) avant d'être fixées grâce à une incubation dans une solution de PAF à 4%. Après rinçage (NaCl 0,9%), 1es coupes sont séchées et placées sur un film radiosensible pour l'autoradiographie.

2.3. Autoradiographie et analyse des images

Après incubation avec les solutions de molécules radioactives, les coupes sont séchées puis placées au contact d'un film radiosensible. L'analyse et la quantification des images autoradiographiques sont réalisées de la même façon que dans la partie II.I.A.3.2, page 90.

3. Imagerie *in vivo*

3.1. Protocole expérimental pour l'évaluation de A93 *in vivo*

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement de A93 *in vivo* chez la souris est présenté sur la figure 46.



Figure 46: Protocole expérimental *in vivo* pour A93

L'échelle de temps est exprimée en minutes.

Les radiotraceurs sont injectés dans l'une des veines latérales de la queue. Les animaux sont anesthésiés pour la durée de l'imagerie par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (50 mg/kg) / xylasine (10 mg/kg) en rapport 2/3 et 1/3 à raison de 1 ml/kg.

3.2. Acquisition des images

Le suivi des composés radioactifs A93 est réalisé sur une γ-caméra dédiée au petit animal (NanoSPECT-CT, Bioscan). Dans ce cas, les acquisitions tomographiques en TEMP sont réalisées à l'aide du logiciel Nucline. Une acquisition en tomographie rayon X est effectuée grâce au scanner rayon X couplé à la caméra TEMP.

3.3. Analyse des images TEMP et quantification

La reconstruction, l'analyse et la quantification des images scintigraphiques tomographiques sont assurées par le logiciel "In Vivo Scope". Les données sont exprimées en MBq/voxels et corrigées de la décroissance radioactive.

4. Analyses *post-mortem*

4.1. Autoradiographie sur coupes de cerveau *ex vivo*

A l'issue de l'acquisition des images *in vivo*, les animaux sont euthanasiés par inhalation de CO_2 et des coupes de cerveau de 20 µm d'épaisseur sont réalisées dans le plan transverse comme décrit précédemment (Partie II.I.A.3.1, page 90). Le protocole pour l'autoradiographie est identique à celui décrit précédemment (Partie II.I.A.3.2, page 90).

4.2. Biodistribution par prélèvement d'organes

Pour réaliser la biodistribution des composés A93, le protocole décrit dans la partie II.III.A.3.2 (page 102) a été utilisé. Les composés évalués étant radiomarqués au ^{99m}Tc, la fenêtre énergétique utilisé pour le compteur γ a été modifié à 100-168 KeV et les valeurs obtenues ont été corrigées de la décroissance radioactive du radiotraceur.

B. Résultats

1.1. Radiochimie du composé A93

Les profils CLHP avant radiomarquage, après radiomarquage et après administration du composé chez l'animal sont indiqués sur la figure 47.

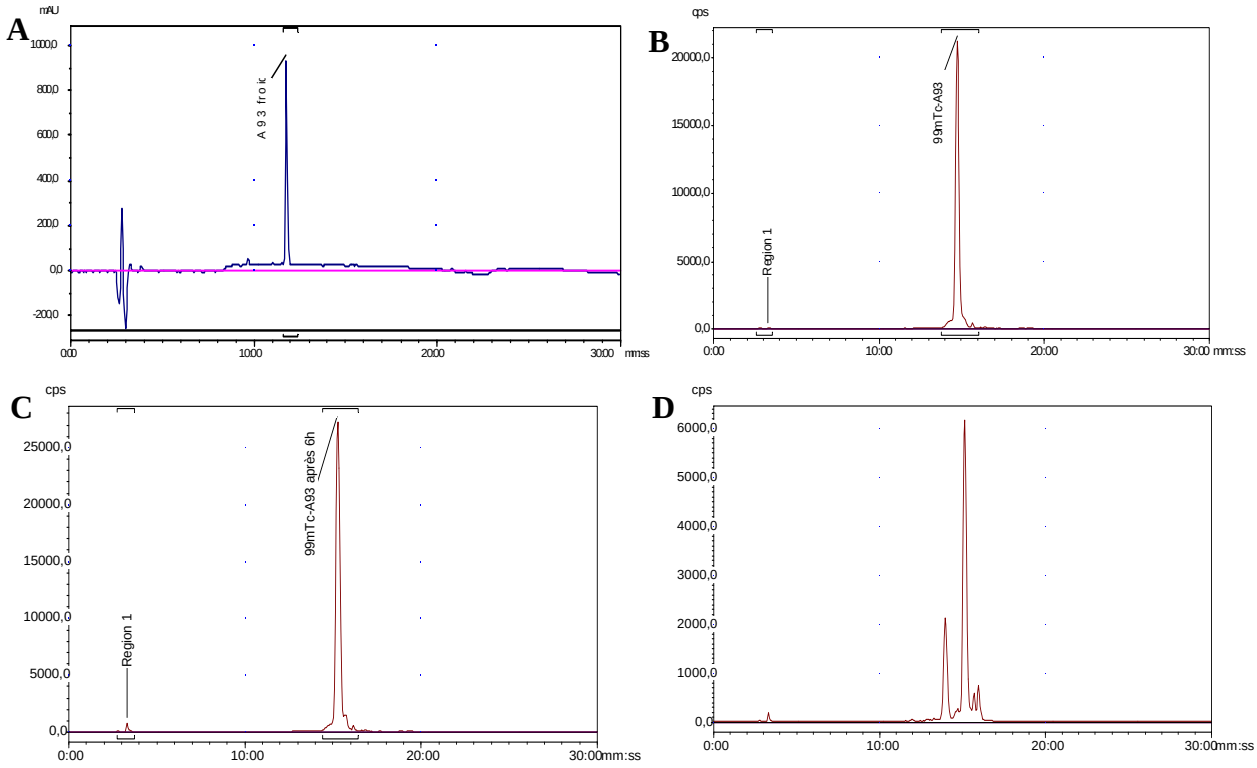


Figure 47: Analyse de la pureté du radiomarquage et de la stabilité de A93 *in vivo*

Exemples de profils chromatographiques obtenus en UV avant radiomarquage (A), immédiatement après radiomarquage (B), 6 heures après radiomarquage dans le liquide de marquage (C) et dans le plasma de souris 45 minutes après administration du radiotraceur à l'animal (D).

Le profil CLHP obtenu par détection UV indique que le produit issu de la synthèse est pur (Figure 47-A). Le radiomarquage est réalisé avec une pureté radiochimique (PRC) supérieure à 95% (Figure 47-B). Le protocole utilisé permet d'obtenir 1 molécule d'A93 marquée pour 2172 ± 34 molécules totales. Six heures après marquage, dans la solution de radiomarquage, le composé est stable. Le profil CLHP est très proche de celui obtenu juste après radiomarquage et la PRC est toujours supérieure à 95% (Figure 47-C). 45 minutes après l'administration du composé chez la souris, l'animal est euthanasié et la stabilité du traceur est évaluée dans le plasma sanguin. Le profil CLHP montre une dégradation notable du traceur puisqu'il ne représente plus que 68% de l'activité détectée. Plusieurs produits de dégradation sont retrouvés avec notamment un composé qui représente 23% de l'activité détectée (Figure 47-D).

1.2. Analyse de la fixation de A93 aux éléments sanguins

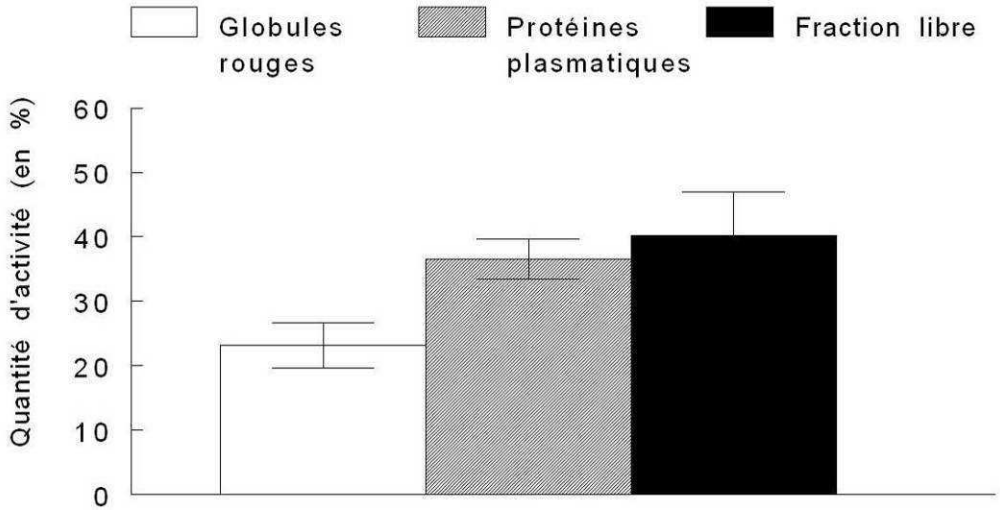


Figure 48: Liaison de A93 avec les éléments présents dans le sang 45 minutes après injection du radiotraceur

Quantification des quantités relatives de A93 libre ou lié aux protéines plasmatiques, aux globules rouges, effectuée 45 minutes p.i.. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité sanguine totale. n=2/condition.

La proportion de traceur libre et de traceur lié aux protéines plasmatiques est équivalente à 45 minutes p.i. (37 et 40% de l'activité sanguine totale pour la fraction liée aux protéines et la fraction libre respectivement) (Figure 48). La quantité d'activité relative aux globules rouges est plus limitée (23%).

1.3. Imagerie *in vivo* de la distribution cérébrale de A93

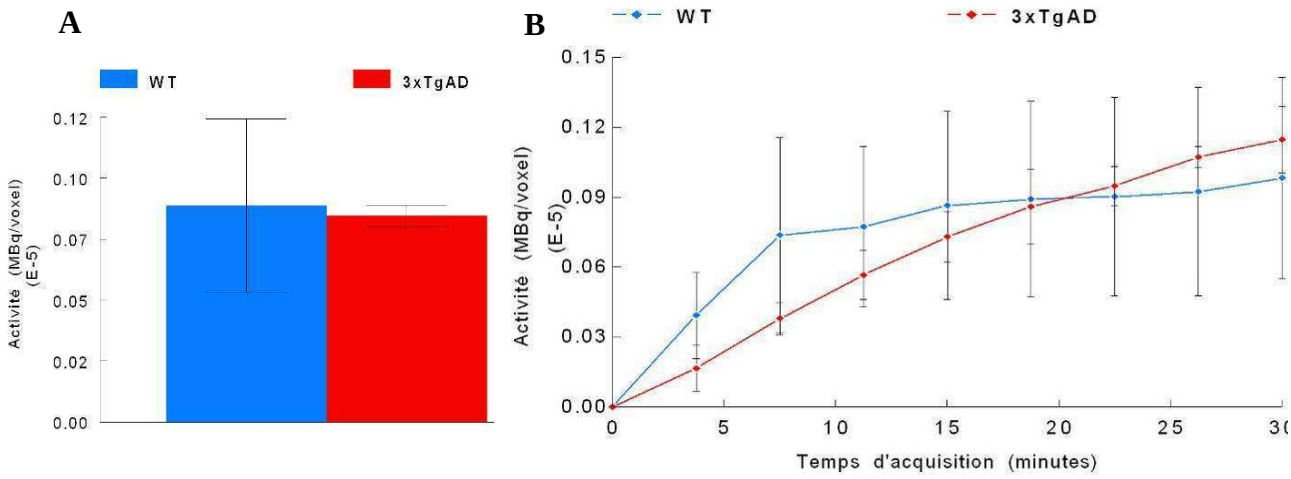


Figure 49: Quantification de l'imagerie TEMP *in vivo* dans le cerveau de souris après administration de A93

A: Quantification de l'activité cérébrale pendant les 30 minutes d'acquisition. B: Quantification de l'activité cérébrale au cours du temps pendant l'acquisition TEMP. L'activité est ainsi mesurée toutes les 3 minutes et 45 secondes. L'activité est exprimée en MBq/voxels. n=4/groupe.

La quantification des images TEMP ne fait apparaître aucune différence significative entre les deux groupes de souris WT et 3xTgAD âgées de 18 à 23 mois, que ce soit en sommant toute l'activité mesurée au cours de l'acquisition des images (Figure 49-A), point par point aux différents temps disponibles (Figure 49-B), ou encore en comparant la variance des cinétiques d'accumulation des composés *in vivo* (Figure 49-B).

1.4. Imagerie autoradiographique *post mortem* sur coupes de cerveau

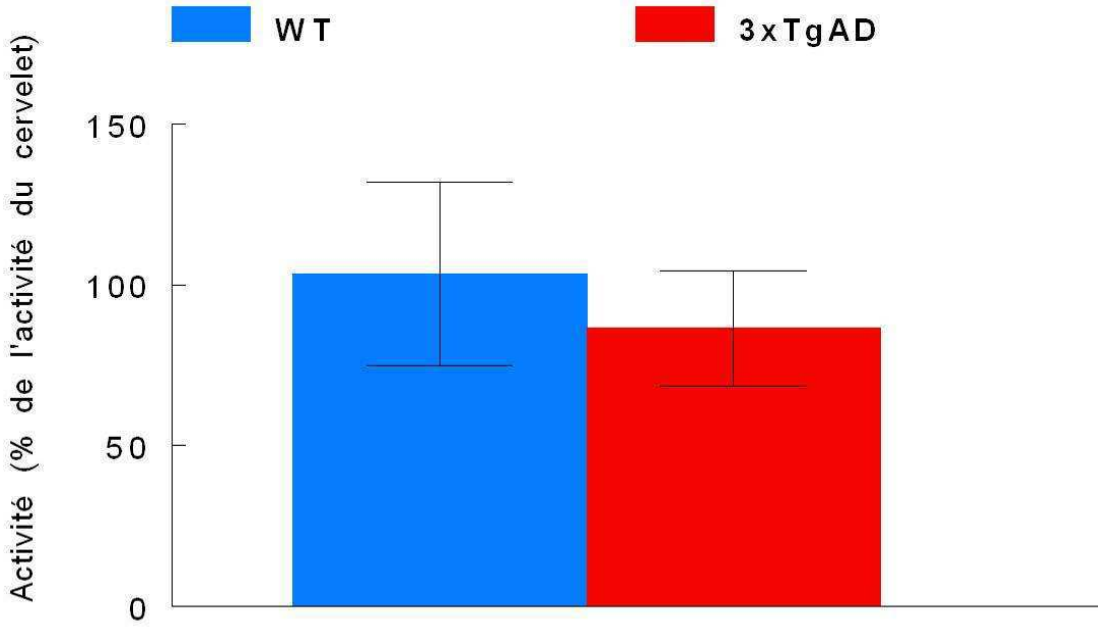


Figure 50: Quantification de l'autoradiographie des coupes de cerveau de souris après injection de A93
Le prélèvement du cerveau est réalisé 30 minutes après injection du radiotraceur. La quantification est effectuée sur l'ensemble des coupes recueillies. L'activité est exprimée en pourcentage de l'activité mesurée dans le cervelet. n=2/groupe.

Les résultats de l'autoradiographie indiqués sur la figure 50 ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes d'animaux. L'activité relevée sur le film radiosensible est très faible ce qui rend les quantifications délicates. A cause de cette faible activité, il est difficile de réaliser des zones d'intérêt de façon précise sur certaines régions du cerveau en particulier. L'analyse a donc été réalisée sur l'ensemble des coupes disponibles lissant les différences potentielles entre les différentes zones.

1.5. Liaison de A93 sur coupes de cerveau de souris

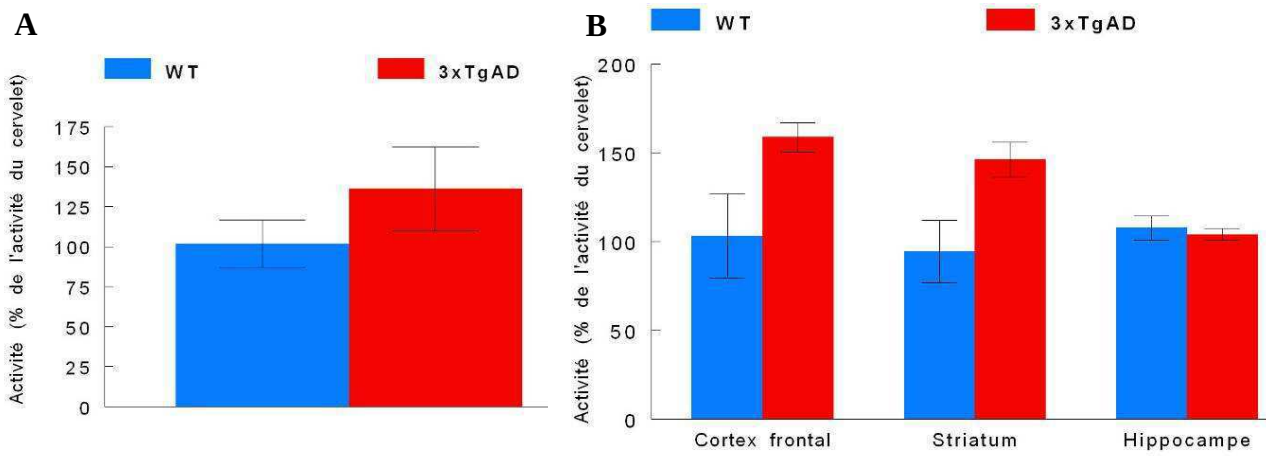


Figure 51: Quantification de l'autoradiographie après liaison de A93 sur des coupes de cerveau

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité mesurée dans le cervelet. A: Quantification de l'activité sur l'ensemble de la surface des coupes de cerveau, B: Quantification réalisée de manière localisée sur le cortex frontal, le striatum et l'hippocampe. n=2/groupe.

La quantification des images autoradiographiques ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes d'animaux (Figure 51). Lorsque la quantification est réalisée de manière localisée au niveau du cortex frontal, du striatum, de l'hippocampe et du cervelet, il semble qu'une quantité plus élevée de radiotraceur se fixe sur les coupes de cerveau de souris 3xTgAD dans le cortex frontal et le striatum (Figure 51-B). Ces différences ne sont cependant pas statistiquement significatives. Contrairement à ce qui était attendu, il n'y a pas de différence de fixation du radiotraceur dans l'hippocampe entre les souris WT et 3xTgAD âgées de 18 à 23 mois. Ces expériences ont été réalisées avec un nombre restreint d'animaux et devront être renouvelées, notamment afin de clarifier les résultats obtenus au niveau du cortex frontal et du striatum.

1.6. Biodistribution par prélèvement d'organes

Les résultats de la biodistribution de A93 chez les souris 3xTgAD et contrôles sont présentés sur la figure 52.

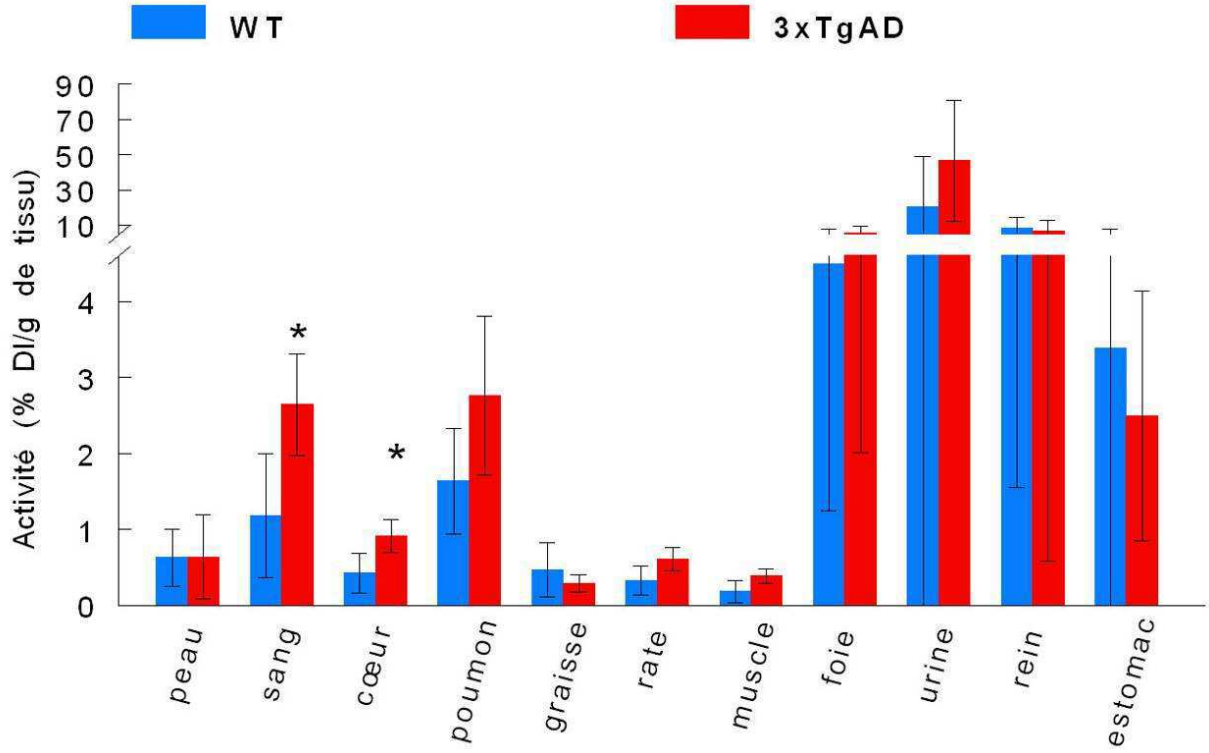


Figure 52: Biodistribution par prélèvement d'organes chez la souris après administration de A93

Le prélèvement d'organes est réalisé 40 minutes après injection du radiotraceur. L'activité est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu frais. n=4 WT et n=3 3xTgAD. * p<0,05 vs WT.

L'élimination de A93 est assurée de manière équivalente par les voies hépatobiliaire et rénale. A93 est significativement présent en plus grande quantité dans le sang et dans le cœur des souris 3xTgAD âgées de 18 à 23 mois (p=0,049 et p=0,044 respectivement). La distribution du traceur est similaire entre les deux groupes d'animaux dans tous les autres organes considérés.

C. Discussion

A93 est un peptide linéaire de 7 acides aminés marqué au technétium 99m destiné à cibler les protéines Tau agrégées. La formule du peptide utilisé ne peut être décrite dans ce manuscrit pour des raisons de confidentialité mais sa séquence a été sélectionnée pour reconnaître les agrégats de protéines Tau déjà formés. Nous avons dans un premier temps réalisé le radiomarquage de cette séquence peptidique afin de pouvoir étudier ses performances sur des

coupes de cerveau et chez la souris *in vivo*. Le radiomarquage de A93 est réalisé avec une bonne pureté radiochimique (supérieure à 95%) et il est stable dans le temps. La stabilité du composé dans le temps après l'administration *in vivo* est jugée relativement faible avec 32% de produits de dégradation dans le plasma 45 minutes après l'administration du radiotraceur. La biodisponibilité de A93 dans l'organisme des souris est jugée satisfaisante puisque près de 40% de la quantité de radiotraceur injectée est retrouvée sous forme libre dans le plasma, 45 minutes après avoir été administré.

L'imagerie TEMP *in vivo* ne permet pas d'établir de différence significative entre les deux groupes d'animaux sur l'ensemble du temps d'acquisition de la radioactivité. De la même façon, ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative en terme de cinétique d'accumulation du composé dans le cerveau des souris 3xTgAD et contrôles âgées de 18 à 23 mois. L'imagerie autoradiographique *ex vivo* sur coupes de cerveau réalisée après l'injection des radiotraceurs aux animaux, ne révèle pas de différence significative entre les souris 3xTgAD et contrôles. Les résultats de l'imagerie TEMP et de l'autoradiographie *ex vivo* indiquent également que le produit pénètre très faiblement dans le tissu cérébral. La biodisponibilité cérébrale du traceur devra être déterminée précisément dans une étude ultérieure.

L'imagerie autoradiographique *in vitro*, réalisée sur des coupes de cerveau sur lesquelles nous avons réalisé une liaison de A93, indique que A93 se lie en quantité plus élevée sur les coupes issues des animaux contrôles que des animaux 3xTgAD. Ce résultat va à l'inverse de celui attendu puisque A93 est censé se lier aux agrégats de protéine Tau présents chez les souris 3xTgAD. Les raisons de cette inversion ne sont pas encore comprises, cependant on observe une fixation différentielle notable qui pourrait permettre à terme de distinguer les deux groupes d'animaux. Ce résultat devra être confirmé par la suite.

La mise en évidence de résultats significatif *in vitro* mais pas *in vivo* indiquent que A93 ne peut être administré en l'état à l'animal. D'autres expériences avec différents peptides nous ont conforté dans l'idée que les peptides administrés seuls dans l'organisme sont rapidement dégradés et ont une faible capacité à passer la barrière hématoencéphalique. Nous avons donc conclu qu'il fallait développer une stratégie de vectorisation des peptides pour leur permettre de passer la barrière hématoencéphalique.

D. Conclusion

La progression des dégénérescences neurofibrillaires est très bien corrélée à la progression des symptômes lors du développement de la MA. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode efficace pour réaliser le suivi de ces lésions chez les patients atteints de cette pathologie. Notre objectif est de développer un radiotraceur des DNF qui permettra l'imagerie dynamique de cet aspect de la MA. L'utilisation de peptides en tant qu'outils de reconnaissance des protéines Tau agrégées est un moyen efficace, spécifique et polyvalent pour cette étude. Différents peptides ont été évaluées lors de ce travail de thèse. A93 est l'un de ces composés. L'activité de reconnaissance de ces molécules est limitée *in vivo* par le problème du passage de la barrière hématoencéphalique. Pour atteindre notre objectif et suivre les lésions neurofibrillaires *in vivo*, il nous faudra utiliser un vecteur permettant de faire pénétrer ces peptides dans le tissu cérébral.

IV. Evaluation biologique de vecteurs de peptides : C6 et C3

Face au problème du passage des peptides à travers la barrière hématoencéphalique, rencontré lors de l'étude de A93, nous avons développé de façon conjointe un vecteur permettant de transporter des séquences peptidiques dans l'organisme vers le tissu cérébral. Ce véhicule peut porter jusqu'à 3 "fonctions" différentes: deux modules de reconnaissance de cible (séquences peptidiques par exemples) et un module de détection (atome radioactif ou fluorophore). Pour des raisons de confidentialité, les séquences des vecteurs étudiés ne seront pas décrites dans ce manuscrit. Nous avons évalué le comportement biologique de deux composés C3 et C6, qui diffèrent uniquement par le nombre de carbones qui les composent. La configuration de C6 et C3 offre de nombreux avantages: il est possible de complexer plusieurs séquences de reconnaissance pour augmenter l'affinité et la spécificité du traceur pour les DNF, le radiomarquage se fait toujours sur la même position ce qui devrait le rendre plus aisé à réaliser et enfin, des données récentes de la littérature nous laissent à penser que cette molécule peut passer la barrière hématoencéphalique. Nous avons évalué la capacité de C3 et C6 à passer seuls dans le tissu cérébral *in vivo* chez la souris WT puis 3xTgAD afin de l'utiliser en tant que vecteur de séquences de reconnaissance des protéines Tau hyperphosphorylées.

A. Matériels et méthodes

1. Radiochimie

1.1. Radiomarquage

Le protocole de radiomarquage de C6 et C3 est presque identique à celui mis en œuvre pour le radiomarquage de A93. Seules les températures et les durées d'incubation du mélange cœur tricarbonyle technétié / composé à marquer sont modifiés. Pour C6, le mélange est incubé à 60°C pendant 30 minutes. Pour C3, le mélange est incubé à 80°C pendant 15 minutes. L'analyse de la pureté radiochimique est effectuée comme décrit dans la partie III.III.A.1.3, page 135.

1.2. Analyse de la stabilité de C6 et C3 *in vivo* chez la souris

Pour les études de stabilité *in vivo*, le traceur technétié (C6 ou C3) est injecté aux souris et analysé aux différents temps choisis (5, 10, 45 minutes) post-injection en prélevant le sang.
Le protocole décrit précédemment pour A93 ne peut être utilisé pour ces composés. En effet, C6 et C3 sont retenues sur la membrane filtrante (NanoSep® oméga™ Pall Life sciences)

qu'elle soit de 30 kDa ou 10 kDa. La précipitation des protéines peut se faire par différentes techniques. L'une des plus usuelles est la précipitation par l'acide trichloroacétique (TCA). Cette approche consiste à mettre la solution marquée en présence de TCA, laisser quelques minutes et ensuite centrifuger 2 minutes à 3000 g pour bien séparer les protéines précipitées du surnageant contenant le traceur technétié.
La stabilité du traceur est alors appréciée en analysant le filtrat par radio-CLHP dans les conditions habituelles.

2. Protocole expérimental pour l'évaluation de C6 et C3 *in vivo*

Le protocole expérimental permettant d'évaluer le comportement de C6 et C3 *in vivo* chez la souris est présenté sur la figure 53.

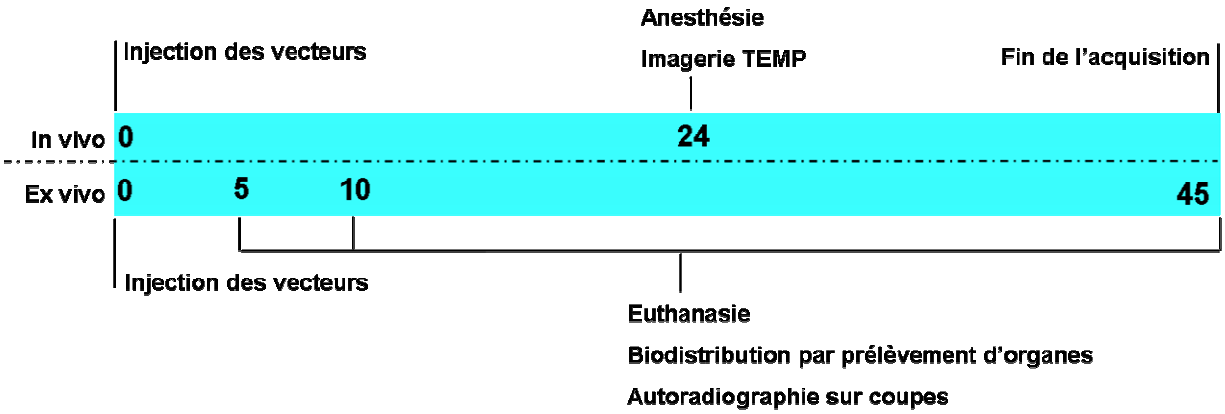


Figure 53: Protocole expérimental *in vivo* pour C6 et C3
L'échelle de temps est exprimée en minutes.

Les radiotraceurs sont injectés dans l'une des veines latérales de la queue. Les animaux sont anesthésiés pour la durée de l'imagerie par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (50 mg/kg) / xylasine (10 mg/kg) en rapport 2/3 et 1/3 à raison de 1 ml/kg.
L'acquisition, l'analyse des images et la quantification sont réalisées comme décrit dans la partie III.III.A.3, page 137.

3. Analyses *post-mortem*

L'autoradiographie sur coupes de cerveau *ex vivo* ainsi que la biodistribution par prélèvement d'organes sont effectuées comme lors de l'évaluation de A93 (Partie III.III.A.4, page 138).

B. Résultats

1.1. Radiochimie des vecteurs C6 et C3

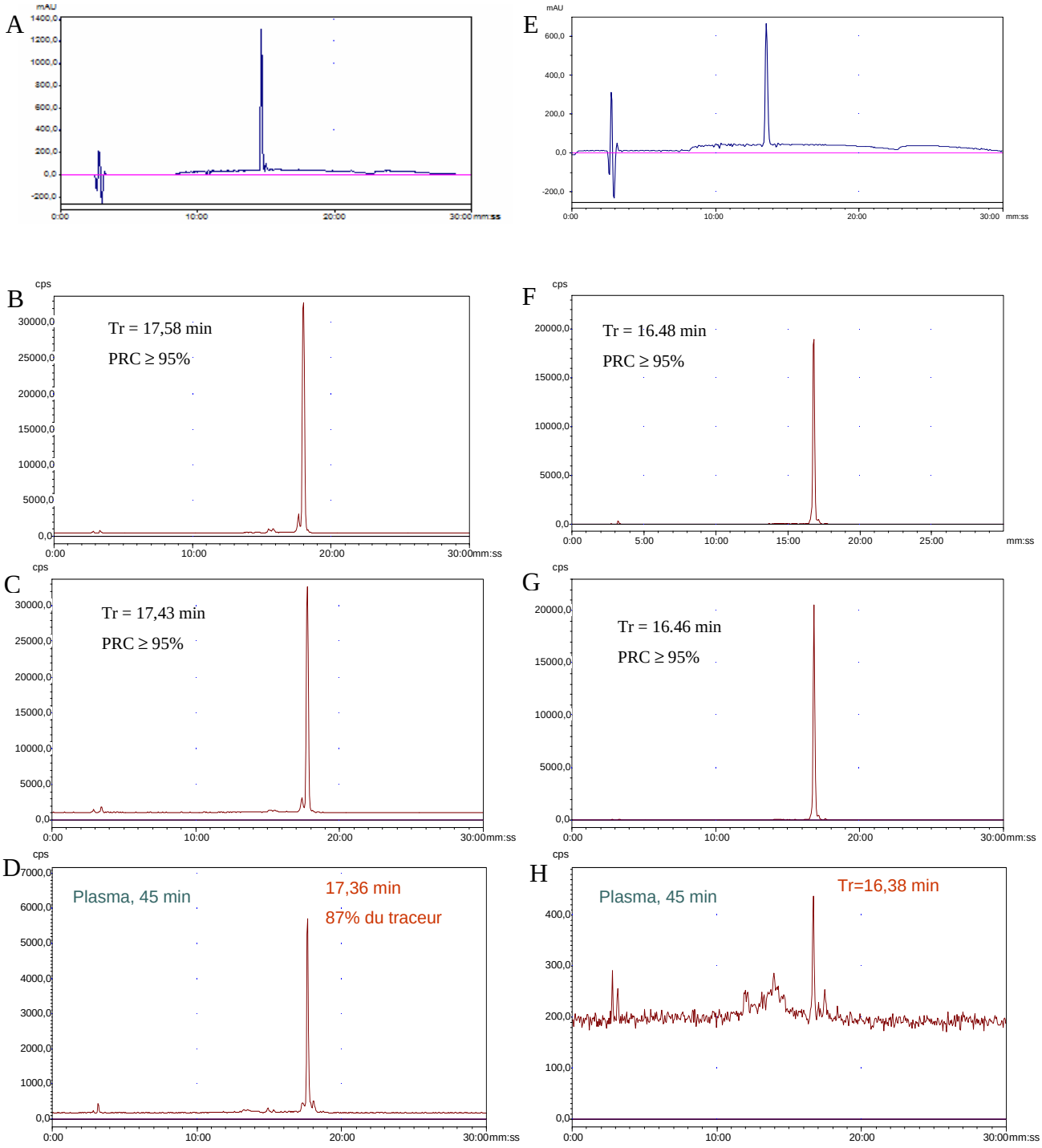


Figure 54: Analyse de la pureté du radiomarquage et de la stabilité de C6 et C3 *in vivo*

Exemples de profils chromatographiques obtenus en UV avant radiomarquage (A, E), immédiatement après radiomarquage (B,F), 6 heures après radiomarquage dans le liquide de marquage (C, G) et dans le plasma de souris 45 minutes après administration du radiotraceur à l'animal (D, H). Les profils relatifs à C6 correspondent aux figures A, B, C, D et ceux relatifs à C3 correspondent aux figures E, F, G, H. Tr : Temps de rétention ; PRC : Pureté radiochimique.

Les profils CLHP obtenus par détection UV indiquent que les composés C6 et C3 issus de la synthèse ne présentent pas d'impureté ou de composé secondaire pouvant nuire à la qualité du radiomarquage (Figure 54 A et E). La pureté radiochimique (PRC) est supérieure à 95% pour les deux composés (Figure 54 B et F). Le protocole de radiomarquage mis en œuvre permet d'obtenir 1 molécule marquée pour 3743 ± 388 molécules totales pour C6 et 1 molécule marquée pour 3762 ± 513 molécules totales pour C3. Les deux composés sont stables 6 heures après marquage, dans la solution de radiomarquage. Les profils CLHP sont très proches de ceux obtenus juste après radiomarquage et les PRC sont toujours supérieures à 95% (Figure 54 C et G). 45 minutes après l'administration du composé chez la souris, l'animal est sacrifié et la stabilité des traceurs est évaluée dans le plasma sanguin et dans l'urine. Le profil obtenu pour C6 indique une PRC encore convenable après passage chez l'animal (Figure 54-D). En revanche, le profil de C3 est beaucoup moins bon avec disparition presque totale du pic correspondant au traceur d'intérêt (Figure 54-H). Ce résultat est cependant à vérifier compte tenu des analyses de stabilité réalisées à 10 minutes post-injection qui indiquait une stabilité plus proche de celle observée avec C6 (données non présentées). Les analyses de stabilité dans l'urine à 10 et 45 minutes après injection des composés (données non présentées) indiquent que de nombreux produits de dégradation sont présents dans cette voie d'élimination avec globalement 35% de composés intacts à 10 minutes et moins de 20%, 45 minutes après l'administration à l'animal.

1.2. Analyse de la répartition des radiotraceurs dans le sang

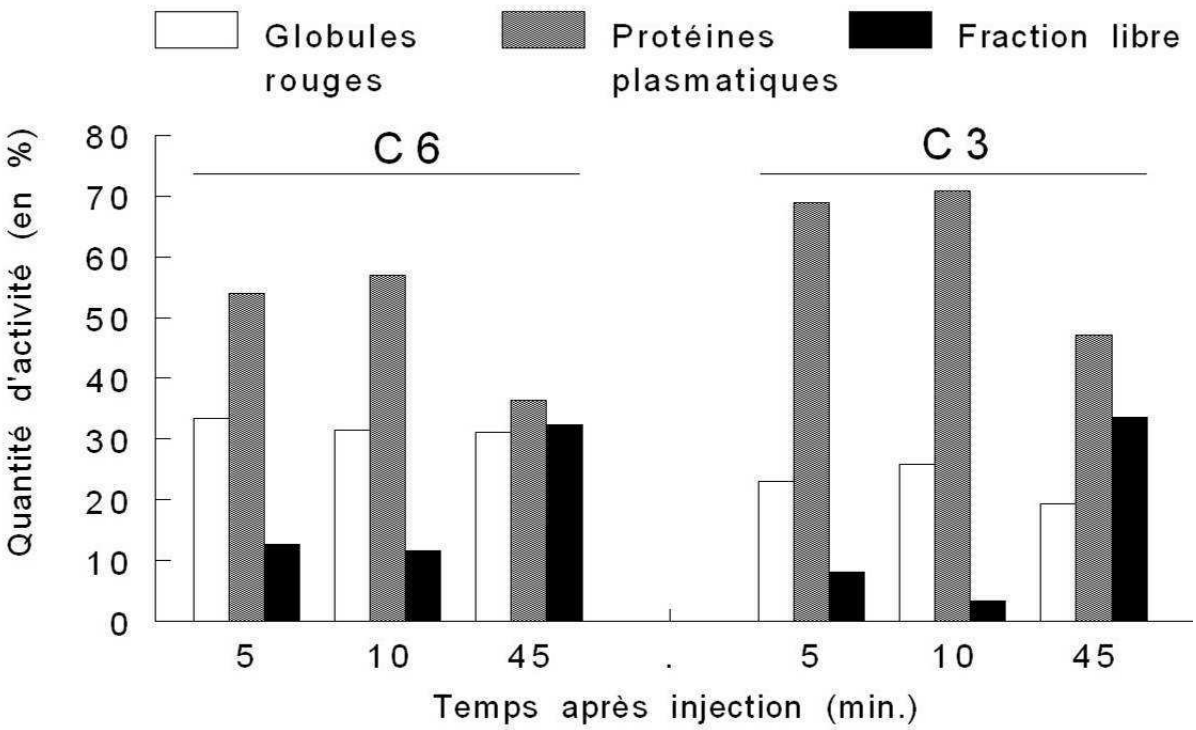


Figure 55: Répartition des radiotraceurs dans le sang

Analyse de la fixation des deux composés technétiés sur les globules rouges, les protéines plasmatiques et mesure de la quantité de traceur libre dans le plasma. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité totale mesurée dans le sang.

C6 et C3 se lient fortement aux protéines retrouvées dans le plasma notamment aux temps courts (Figure 55). Cet effet est visible jusqu'à 45 minutes post-injection (p.i.). Aux trois temps étudiés, C3 est associée de manière plus importante aux protéines plasmatiques que C6. La proportion de traceur libre est relativement faible à 5 et 10 minutes p.i. (12% et 8% à 5minutes p.i. pour C6 et C3 respectivement). La proportion de traceur libre s'élève par la suite à 32 et 33% de l'activité sanguine pour C6 et C3 respectivement 45 minutes après l'injection des traceurs chez l'animal. La quantité relative de traceurs liés aux globules rouges reste stable au cours du temps (en moyenne 32 et 23% pour C6 et C3 respectivement).

1.3. Evaluation chez la souris Wild-type

1.3.1. Biodistribution de C6 et C3

La figure 56 présente les résultats de la biodistribution par prélèvement d'organes de C6 et C3.

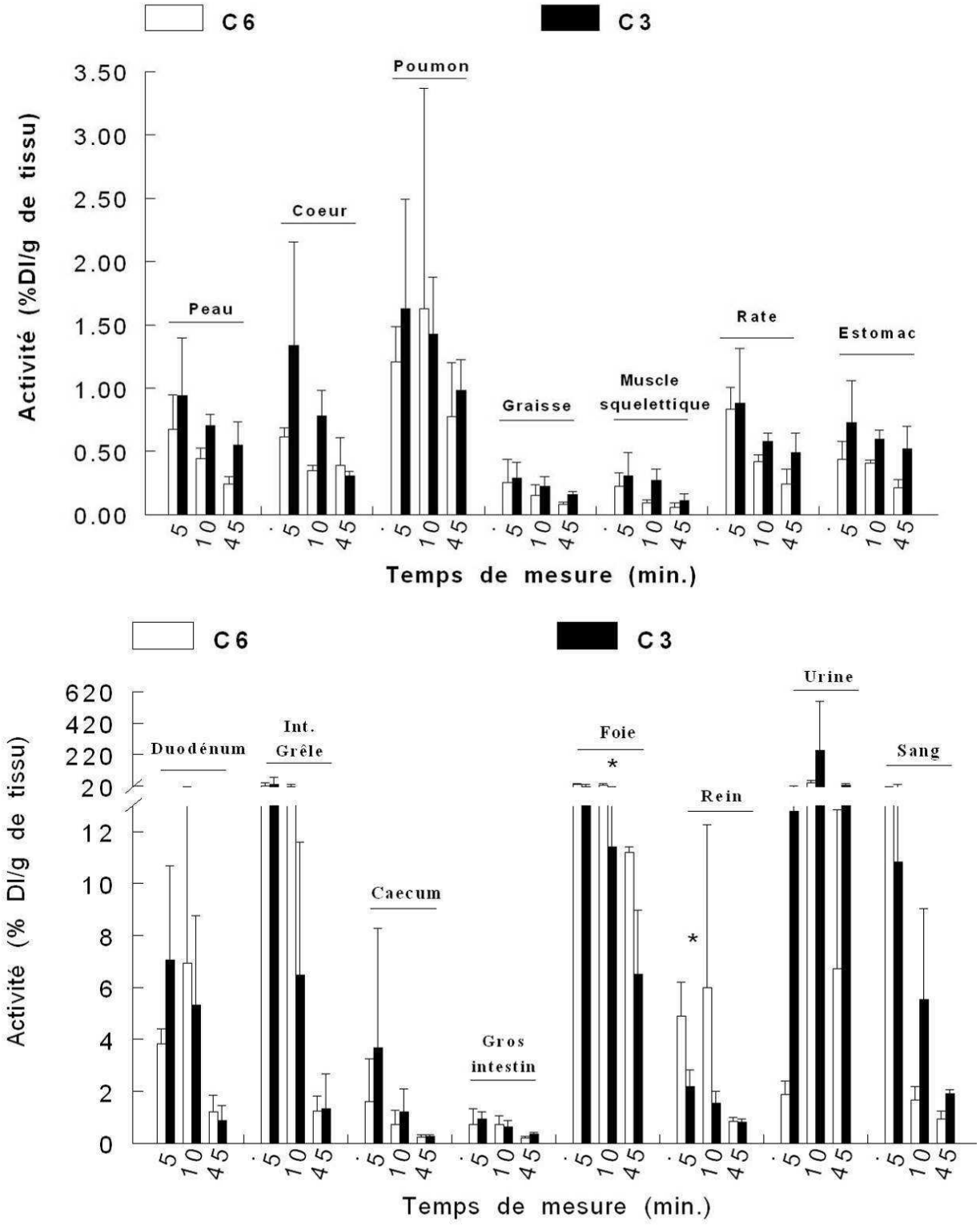


Figure 56: Biodistribution par prélèvement d'organes après administration de C6 et C3

L'activité est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%DI/g). n=3 par temps et par organe * $p<0,05$ vs C3.

Les deux composés sont éliminés préférentiellement par la voie hépatobiliaire comme en témoignent les fortes activités dans le foie et les intestins, lieu de déversement de la bile (Figure 56). Ces activités décroissent graduellement au cours du temps. L'activité est moins importante dans le foie et les reins pour C3 que C6 à tous les temps étudiés. Cette différence est significative à 10 minutes p.i. dans le foie et à 5 minutes p.i. dans les reins. Cette différence pourrait montrer une élimination plus lente du composé C3. Cette observation semble être supportée par la plus haute activité de C3 dans le sang par rapport à C6. Cette activité plus importante dans le sang est bien corrélée avec les résultats indiqués dans le paragraphe précédent (1.2) qui montrent une association plus importante de C3 avec les globules rouges. L'activité dans la paroi de l'estomac est plus élevée pour C3 que pour C6 signifiant une plus grande quantité de technétium libre pour C3. Ces observations viennent encore une fois souligner les résultats de stabilité qui montrent une altération plus importante et plus rapide de C3 *in vivo* (paragraphe précédent 1.1).

1.3.2. Imagerie TEMP *in vivo* de la distribution cérébrale de C6 et C3

Les résultats de la quantification des images scintigraphiques pour l'évaluation de C6 et C3 chez la souris WT sont indiqués sur la figure 57.

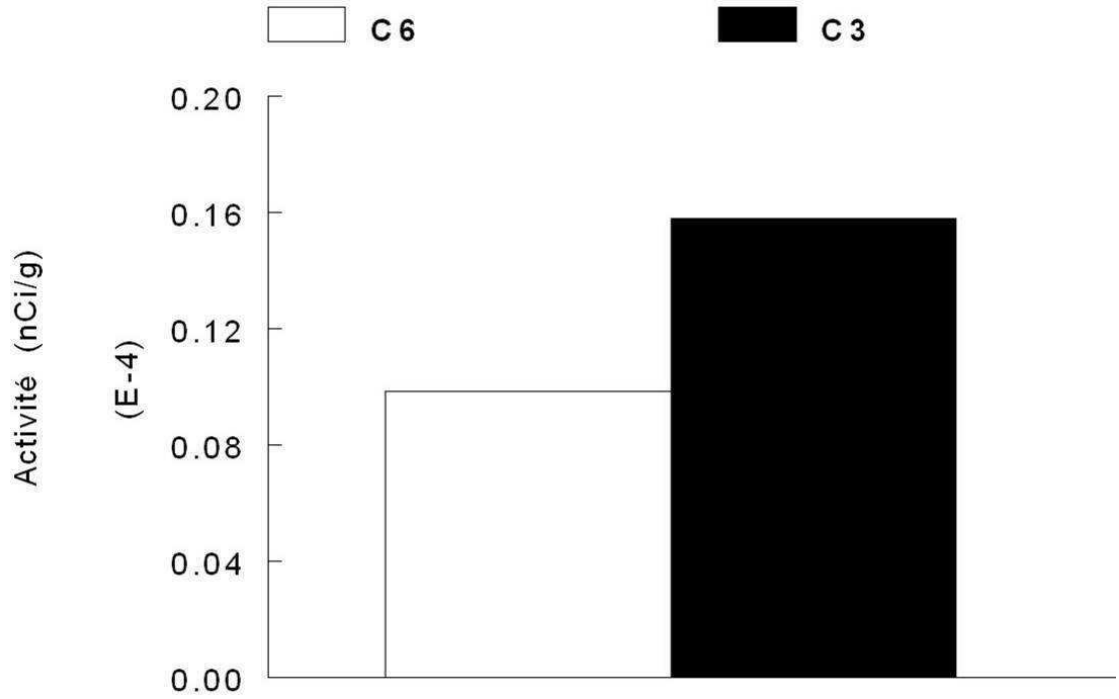


Figure 57: Activité de C3 et C6 dans le cerveau mesurée en imagerie TEMP

L'acquisition de la radioactivité est réalisée de 21 à 45 minutes après l'injection de C3 ou C6. La quantification est réalisée en traçant une zone d'intérêt sur l'ensemble du cerveau à l'aide de l'image au scanner. n=1 pour C6 et n=2 pour C3. L'activité est exprimée en nanocuries par gramme de tissu (nCi/g).

Nous n'avons relevé aucune zone d'intérêt potentiellement plus active que d'autres lors de l'analyse des images; cependant, la sensibilité limitée de la caméra TEMP, combinée à une activité relativement restreinte dans le cerveau ne permet pas d'affirmer qu'il n'y a pas de différence d'activité régionale. La quantification de l'activité indique une tendance vers une pénétration plus importante de C3 dans le cerveau des souris par rapport à C6 (Figure 57). Le rapport C3/C6 est de 1,60. Ce résultat reste à confirmer du fait du faible nombre d'animaux évalués en imagerie.

1.3.3. Quantification de l'activité dans le cerveau par prélèvement de tissu

La quantité de C6 et C3 présente dans le cerveau de souris WT est évaluée par prélèvement du cerveau et comptage de l'activité au compteur γ. Les résultats de cette quantification sont présentés sur la figure 58.

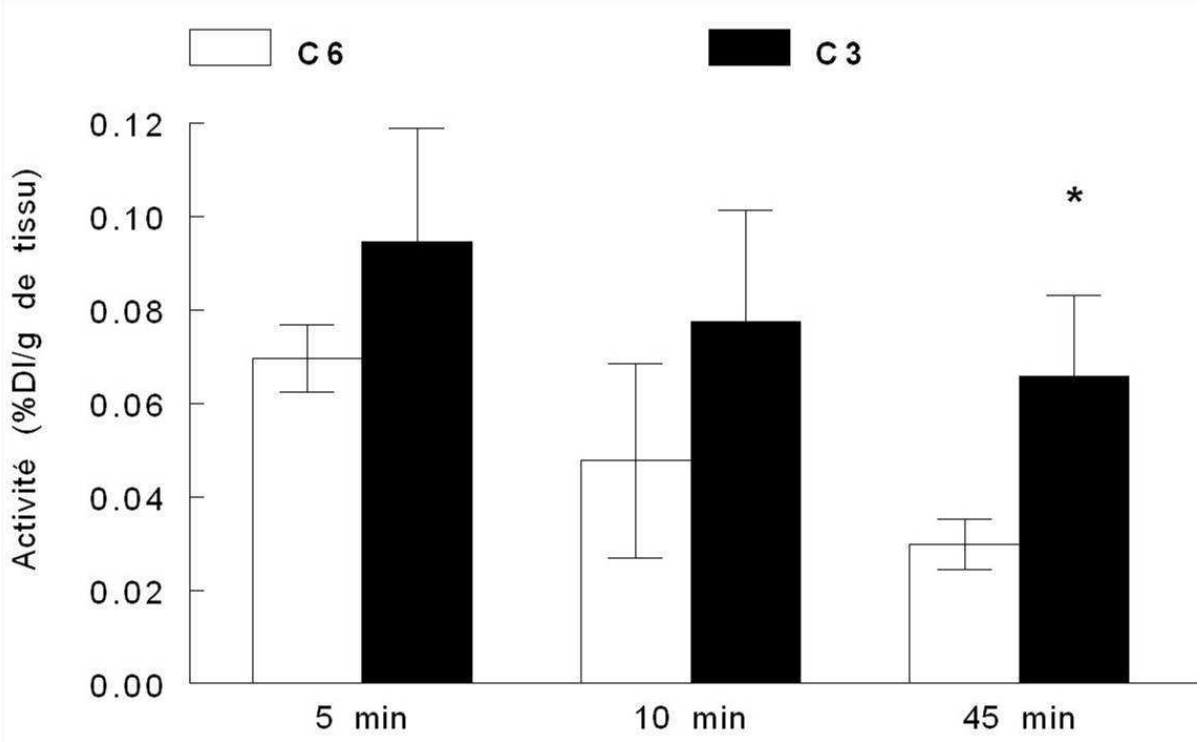


Figure 58: Activité de C3 et C6 dans le cerveau après prélèvement de tissu cérébral

L'activité est mesurée au compteur γ 5, 10 et 45 minutes après administration de C6 ou C3. L'activité est exprimée en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%DI/g). * $p<0,05$ vs C6.

L'activité mesurée par prélèvement tissulaire permet de déterminer la quantité de traceur dans l'ensemble du cerveau sans distinction de régions. L'activité dans le cerveau des souris décroît continuellement au cours du temps de 5 à 45 minutes (Figure 58). Cette quantification fait apparaître une activité plus forte dans les cerveaux de souris après injection de C3 par rapport

à C6. Cette tendance est forte à 5 et 10 minutes p.i. et significative à 45 minutes p.i. (p=0,027). Les rapports C3/C6 passent de 1,36 à 2,20 entre 5 minutes p.i. et 45 minutes p.i..

1.3.4. Autoradiographie sur coupes de cerveau de souris

Les valeurs relevées en imagerie et en biodistribution par prélèvement d'organes ont orienté nos efforts vers l'étude plus approfondie de C3. L'autoradiographie a ainsi été réalisée uniquement avec C3 (Figure 59).

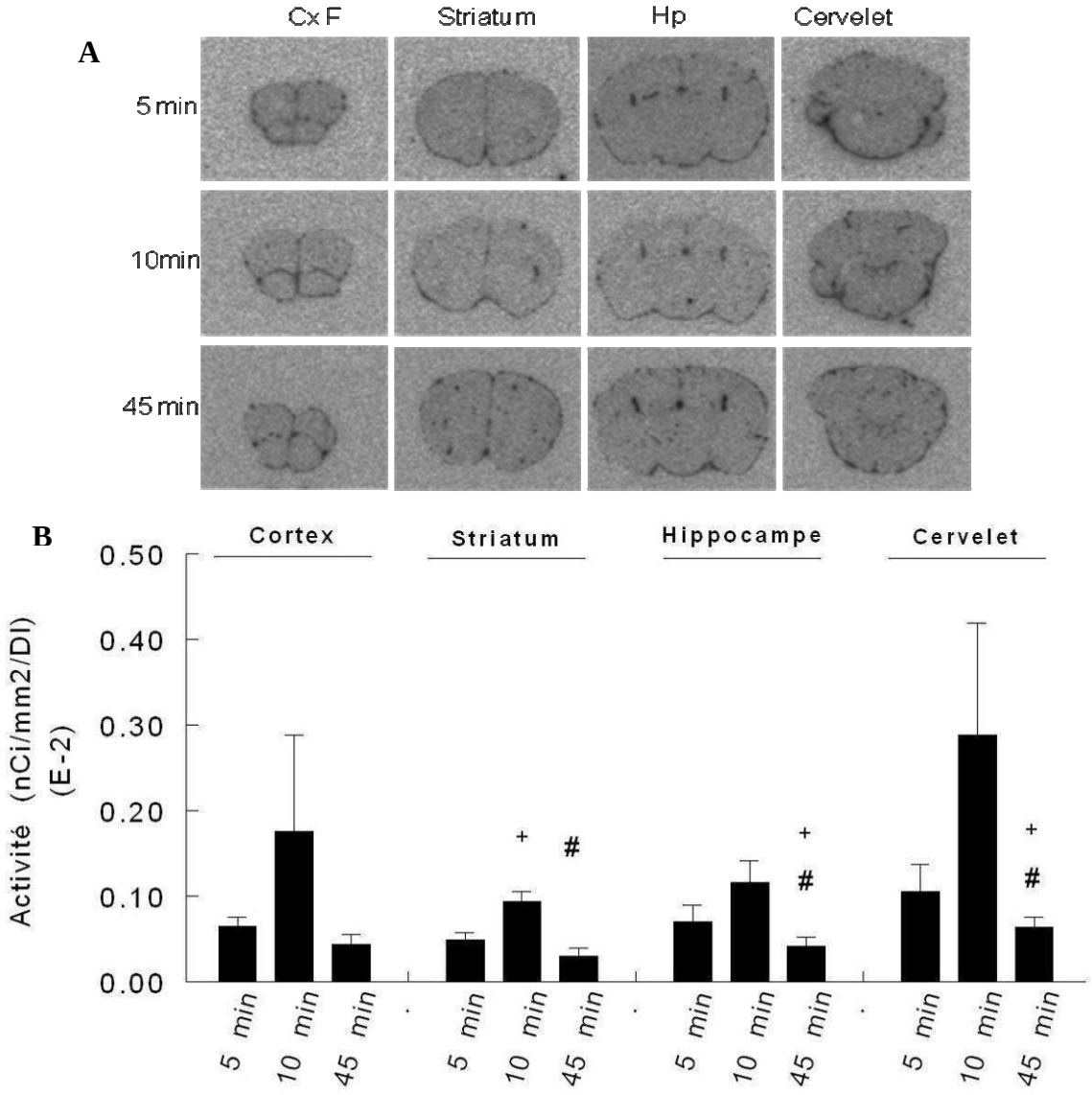


Figure 59: Autoradiographie des coupes de cerveau de souris après administration de C3

A: Exemples d'images autoradiographiques de cerveau de souris WT, 5, 10 et 45 minutes après administration de C3. B: Quantification des images autoradiographiques des cerveaux de souris WT injectées avec C3. L'activité est exprimée en nanocuries par millimètre carré corrigée de la dose injectée (nCi/mm²/DI). n=3/temps. CxF: cortex frontal; Hp: hippocampe, Min: minutes. + p<0,05 vs 5 min, # p<0,05 vs 10 min.

Les images autoradiographiques obtenues à différents temps après l'injection de C3 attestent du passage de ce composé à travers la barrière hématoencéphalique et de sa diffusion dans le tissu cérébral (Figure 59-A). A la vue de ces images, il ne semble pas y avoir de différence régionale de distribution du traceur dans le cerveau de souris. Les espaces ventriculaires sont fortement actifs signe d'une forte présence du radiotraceur dans le liquide céphalo-rachidien.
La quantification de ces images met en évidence le profil de distribution aspécifique de C3 (Figure 59-B). Ce profil n'est pas étonnant étant donné que la molécule ne possède pas les séquences de ciblage de la protéine Tau. Les résultats indiquent une augmentation de l'activité de 5 à 10 minutes dans les différentes structures évaluées. Cette augmentation est significative dans le striatum. De 10 à 45 minutes, l'activité diminue dans ces mêmes régions. Cette diminution est significative dans le striatum, l'hippocampe et le cervelet.

1.4. Distribution de C3 dans le cerveau de souris 3xTgAD

Les résultats obtenus avec la molécule C3 nous ont poussé à déterminer si cette molécule avait les mêmes capacités de passage de la barrière hémato-encéphalique chez la souris 3xTgAD.

1.4.1. Activité de C3 dans le cerveau

L'évaluation de la quantité de C3 présente dans le cerveau de souris 3xTgAD et contrôles est réalisée par prélèvement du cerveau des animaux et comptage de l'activité au compteur γ (Figure 60).

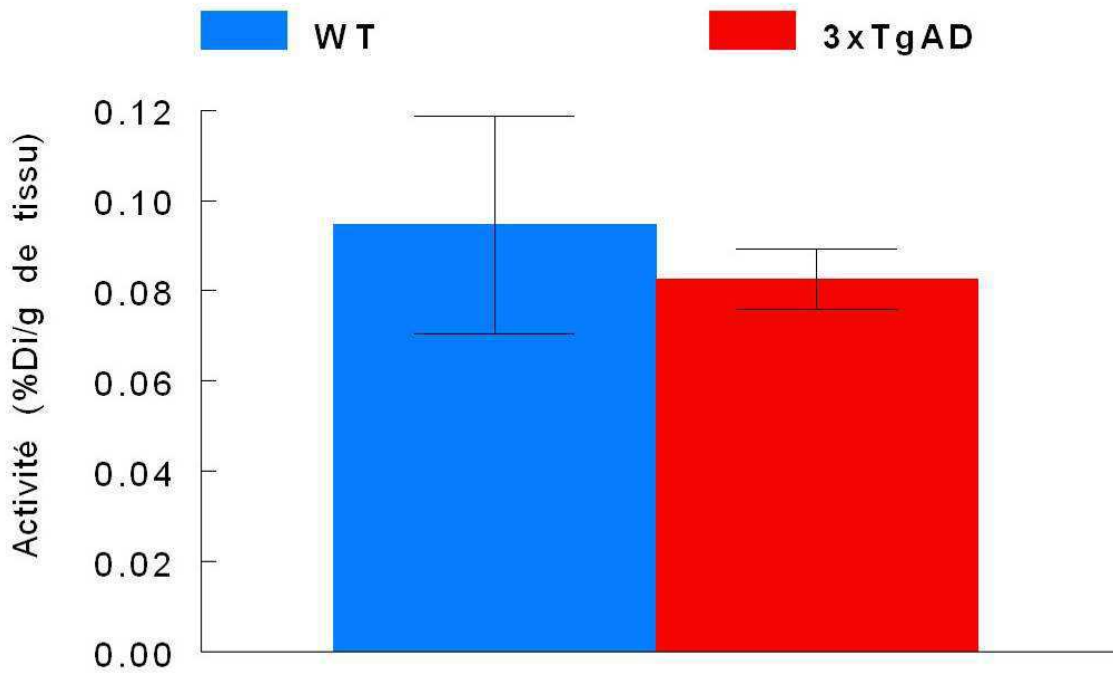


Figure 60: Quantification de l'activité dans le cerveau de souris WT et 3xTgAD 5 minutes après administration de C3

Le prélèvement du cerveau est réalisé 5 minutes après l'injection de C3 chez des souris contrôles WT (n=3) et 3xTgAD (n=3). L'activité est mesurée au compteur γ. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu cérébral (%DI/g).

Cinq minutes après l'injection du radiotraceur, l'activité cérébrale est identique chez les souris WT et les souris 3xTgAD (Figure 60).

1.4.2. Autoradiographie des coupes de cerveau après administration de C3

L'évaluation de la pénétration de C3 dans le tissu cérébral des souris 3xTgAD et contrôles est également effectuée par autoradiographie de coupes de cerveau de souris ayant reçu une injection de C3 (Figure 61).

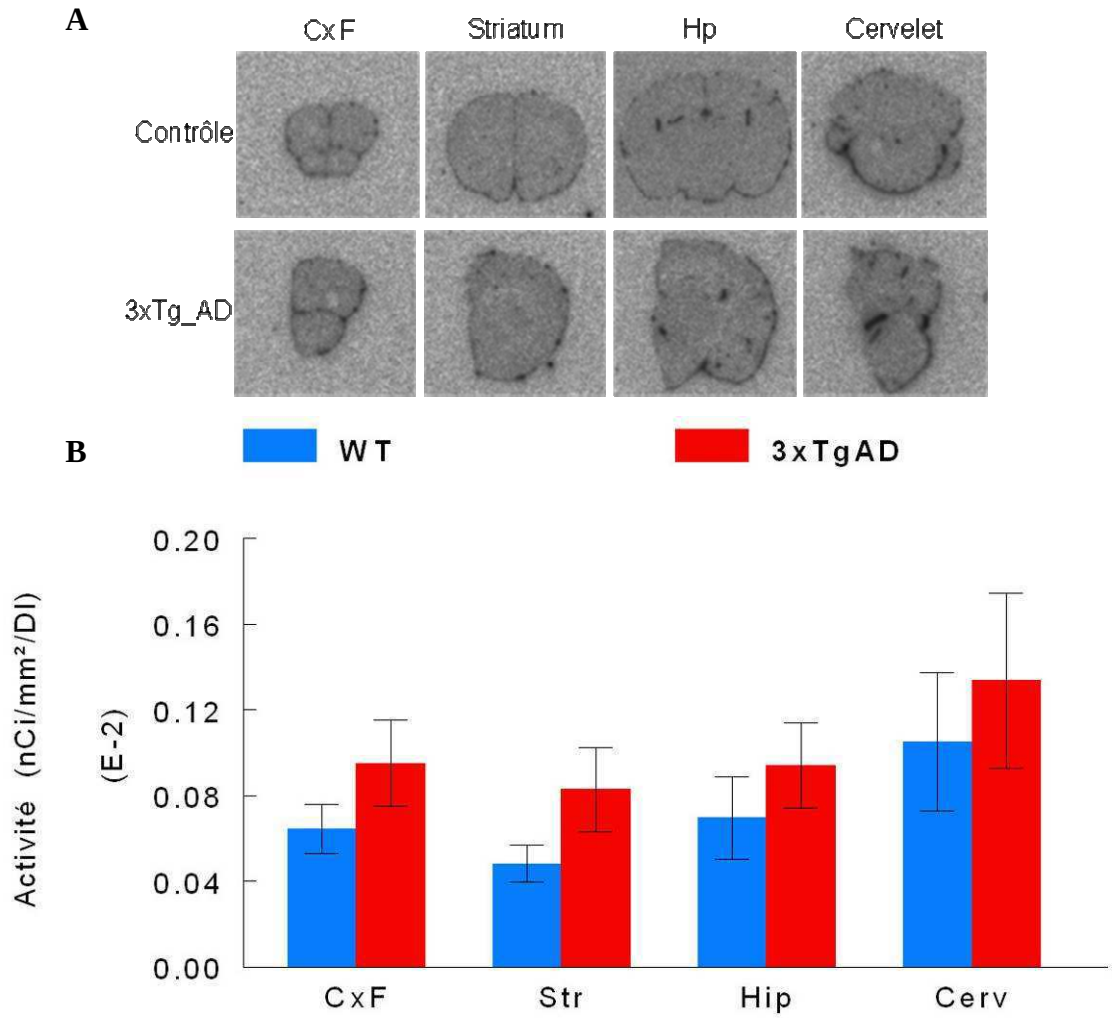


Figure 61: Autoradiographie de coupes de cerveau de souris injectées avec C3

Le prélèvement des cerveaux est effectué 5 minutes après injection du radiotraceur. A: exemples d'images autoradiographiques de coupes transversales de cerveau de souris WT (coupes entières de 8µm) et 3xTgAD (hémicoupes de 20µm). B: quantification des images autoradiographiques exprimée en nanocuries par millimètre carré corrigée de la dose injectée (nCi/mm²/DI). n=3. CxF: cortex frontal; Hp: hippocampe.

La quantification des images autoradiographiques ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les animaux WT et 3xTgAD (Figure 61-B). Chez les deux groupes d'animaux, la distribution du radiotraceur ne semble pas spécifique, cependant de multiples "points chauds" sont observables sur les coupes de tissus issues des animaux transgéniques (Figure 61-A). Ces points chauds ne sont pas présents sur les coupes de tissu issues d'animaux contrôles et pourraient correspondre à des microlésions vasculaires. Dans les deux groupes d'animaux, les espaces ventriculaires sont fortement radioactifs.

C. Discussion

L'utilisation de peptides ou de molécules organiques pour l'imagerie de la protéine Tau dans la MA permet d'obtenir des traceurs très spécifiques de la cible souhaitée et de moduler facilement les séquences pour atteindre des cibles variées. Cette stratégie est cependant fortement limitée par la faible pénétration de ces composés à travers la barrière hématoencéphalique. Ce constat ayant été fait expérimentalement dans notre laboratoire lors de l'utilisation de différents peptides, nous avons décidé de développer un vecteur qui permettrait aux radiotraceurs de passer plus facilement la barrière hématoencéphalique et donc de permettre la reconnaissance de leur cible.

Notre choix s'est porté sur des molécules "fonctionnalisables" sur lesquelles il est possible de greffer à la fois des séquences de reconnaissance et un module de détection comme un isotope radioactif pour permettre leur suivi *in vivo*. Ces composés nous serviront alors de vecteurs ou de châssis moléculaires pour véhiculer les molécules d'intérêt vers leur cible: les DNF. Lors de notre étude, nous avons étudié deux vecteurs: l'une comporte des chaînes latérales composées de six carbones (C6), l'autre de trois carbones (C3). La diminution de la taille des chaînes latérales sur C3 doit permettre de limiter leur mobilité et ainsi limiter des interactions non désirées entre les deux chaînes latérales qui porteront les séquences de reconnaissance. Dans un premier temps nous avons étudié les vecteurs seuls, sans séquences de reconnaissance afin d'évaluer leur capacité intrinsèque à passer la barrière hématoencéphalique.

Le radiomarquage de C3 et C6 a été mis au point et validé au sein du laboratoire. Les deux composés sont stables dans la solution de radiomarquage et dans le plasma jusqu'à 10 minutes après injection des radiotraceurs chez la souris. C6 est stable *in vivo* jusqu'à 45 minutes post-injection chez l'animal. C6 est plus stable *in vivo* que C3 comme en témoignent les profils CLHP réalisés dans le plasma 45 minutes après injection, et les fortes activités relevées dans l'estomac lors des études de biodistribution par prélèvement de tissus pour C3. En effet, si du technétium libre est libéré suite à une dégradation des composés injectés, la paroi de l'estomac le capte et présente une activité plus élevée. L'élimination des deux composés chez la souris se fait essentiellement par la voie hépatobiliaire.

Après prélèvement du cerveau et comptage de l'activité cérébrale 45 minutes après l'injection des radiotraceurs, C3 se trouve en quantité significativement plus élevée dans le tissu cérébral que C6 ($p=0,027$). Dans ces conditions, le rapport C3/C6 est de 2,20. Une expérience préliminaire sur un faible nombre d'animaux a été réalisée en imagerie TEMP afin d'étudier le

comportement des radiotraceurs *in vivo*. Cette expérience présente des résultats proches de ceux trouvés en prélèvement *post-mortem* (C3/C6=1,60), mais ils ne sont pas statistiquement significatifs en raison de l'effectif limité. De nouvelles expériences sont prévues afin de mieux caractériser la cinétique de ces deux radiotraceurs *in vivo* en imagerie TEMP et d'évaluer quelle est la période d'étude la plus adaptée pour chacun. L'imagerie autoradiographique sur coupes de cerveau de souris ayant reçu une injection de radiotraceur montre une activité homogène dans toutes les zones du cerveau avec C3. Ce résultat est tout à fait satisfaisant puisqu'il indique que le vecteur ne se fixe pas en lui-même sur une cible cérébrale particulière et ne risque donc pas d'interférer avec les séquences de reconnaissance qui lui seront associées.

Ces résultats montrent clairement la capacité de ces composés à passer la barrière hématoencéphalique chez la souris contrôle. Nous avons par la suite voulu évaluer s'il existait une différence de pénétration de C3 dans le cerveau entre les animaux contrôles et les animaux 3xTgAD. Un comportement similaire entre les deux groupes de souris est souhaitable pour pouvoir observer l'effet direct de l'ajout de séquence de reconnaissance sans biais d'interprétation du au vecteur. Nous avons donc évalué la quantité de C3 présente dans le cerveau de souris contrôles et 3xTgAD par un comptage de la radioactivité dans le tissu après prélèvement *post-mortem* et en autoradiographie sur coupes de cerveau. Cinq minutes après l'administration des radiotraceurs, la quantité de C3 est équivalente dans les deux groupes de souris. De nouvelles expériences doivent être réalisées à des temps plus long pour compléter cette partie de l'étude.

Nous avons montré que les deux vecteurs étudiés sont capables de passer la barrière hématoencéphalique et que leurs propriétés ne risquent pas d'interférer avec les molécules qui porteront l'activité de reconnaissance de la cible. A présent, le couplage de ces vecteurs avec des peptides comme A93 ou des molécules de synthèse peut être réalisé. La mise au point du radiomarquage et l'évaluation biologique de ces nouvelles entités seront réalisées à court terme. La stabilité de ces radiotraceurs *in vivo*, leur capacité de reconnaissance des protéines Tau *in vitro* ainsi que leur capacité à passer la barrière hématoencéphalique et à cibler les dégénérescences neurofibrillaires *in vivo* seront autant de paramètres essentiels à étudier.

D. Conclusion

Les vecteurs de peptides, C6 et C3, radiomarqués au ^{99m}-Tc sont capables de passer la barrière hématoencéphalique. C3 pénètre plus facilement dans le tissu cérébral et ne présente pas de distribution préférentielle pour une région cérébrale donnée. Sa distribution est également identique entre souris WT et souris 3xTgAD âgées ce qui devrait limiter les artéfacts dus à ce vecteur une fois que les séquences de reconnaissance de la protéine Tau hyperphosphorylée y seront jointes. L'association de ces vecteurs avec différentes séquences de reconnaissance comme A93 est en cours de réalisation et ces complexes feront l'objet d'études biologiques *in vivo* très prochainement.

Conclusion générale

Bien que la maladie d'Alzheimer soit connue depuis plus d'un siècle, la prise en charge de cette pathologie est aujourd'hui encore très compliquée. Un manque de connaissances fondamentales sur la physiopathologie ainsi que l'absence de traitement efficace limitent fortement la prise en charge adaptée de la MA. La mise au point d'outils d'imagerie permettant de suivre les lésions moléculaires qui se développent au cours de la maladie permettrait, d'une part de renforcer le diagnostic aujourd'hui majoritairement réalisé grâce à l'examen clinique, et d'autre part de favoriser et de mieux évaluer le développement de nouvelles thérapies. De plus, sur le plan fondamental, cet axe de recherche permettrait de mieux comprendre les relations temporelles entre les différentes lésions caractéristiques de la MA et d'ouvrir de nouvelles voies de recherche. Parmi les différentes techniques permettant de réaliser ce suivi, l'imagerie nucléaire semble être l'un des outils les mieux adaptés. Cette technique permet de suivre différentes cibles moléculaires ou processus physiologiques grâce à l'utilisation de radiotraceurs spécifiques. Elle est également peu invasive ce qui permet de réaliser un suivi au cours du temps en ayant plusieurs points de mesure. A l'heure actuelle, peu de radiotraceurs ont montré une efficacité suffisante pour être considérés comme outils diagnostiques. Dans ce contexte, notre objectif est de développer de nouveaux radiotraceurs des lésions caractéristiques de la MA afin de réaliser le suivi dynamique *in vivo* de cette pathologie.

Dans un premier temps, nous avons validé un modèle animal de la MA: la souris transgénique 3xTgAD. La souris transgénique 3xTgAD développe des PA et des DNF au cours du vieillissement à partir de l'âge de 12 mois. Ce modèle est tout à fait adapté au développement de radiotraceurs destinés à la détection de ces deux types de lésions.

Par la suite, nous avons évalué le comportement biologique de différents radiotraceurs décrits dans la littérature comme étant des radiotraceurs de la MA. Cette étude a permis de mettre en évidence leur insuffisance pour détecter des modifications métaboliques ou des variations de la charge cérébrale en amyloïde dans ce modèle animal.

Par ailleurs, nous avons initié le développement de plusieurs nouveaux traceurs et vecteurs de traceurs potentiels pour la détection des lésions caractéristiques de la MA: les ^{35}S-calixarènes et les COB pour le suivi des plaques amyloïdes et A93 ainsi que deux vecteurs de peptides pour le suivi des dégénérescences neurofibrillaires.

Les ^{35}S-calixarènes, étudiés pour leur capacité à se fixer sur les motifs présents dans les PA, ont fait l'objet d'une première caractérisation chez l'animal. Leur toxicité relativement élevée ainsi que leur faible capacité à pénétrer dans le tissu cérébral nous ont amené à considérer des modifications chimiques dans le but d'augmenter la lipophilie de ces composés et, ainsi, permettre un meilleur passage de la barrière hémato-encéphalique.
Les composés COB ont la capacité d'interagir avec les fibres d'amyloïdes *in vitro*. La présence de plaques amyloïdes est mise en évidence en microscopie de fluorescence sur des coupes de cerveau de souris 3xTgAD ayant été administrées avec ces composés. De plus, les études réalisées sur cultures cellulaires ont montré que les COB peuvent pénétrer à l'intérieur des neurones et s'accumuler dans le cytoplasme sans induire de toxicité. L'avenir de ces composés en tant que traceur des PA pour l'imagerie reste à définir, cependant leur potentiel en tant que vecteur pour des molécules à visée thérapeutique est à considérer avec attention.
Le choix d'un marqueur peptidique des DNF implique l'utilisation d'un vecteur permettant de favoriser la pénétration des peptides dans le tissu cérébral. Les premiers résultats montrent une bonne capacité de ces composés à atteindre cet objectif. A court terme, la complexation de peptide de détection des DNF avec ce vecteur sera mise en œuvre et l'évaluation de ce nouveau radiotraceur sera réalisée sur le modèle de souris 3xTgAD.

Au cours de ce travail de thèse, toute la méthodologie nécessaire au développement de radiotraceurs spécifiques des lésions amyloïdes et neurofibrillaires a été mise en place. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour la mise au point de nouveaux traceurs potentiels des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Références bibliographiques

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report **2009**.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report: the global economic impact of dementia **2010**.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report: the benefit of early diagnosis and intervention **2011**.

Alzheimer, A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. [On a peculiar disease of the cerebral cortex]. *Allgemeine Zeitschrift fuer Psychiatrie und Psychischgerichtliche Medizin* **1907**.64:146-148.

Amieva, H., M. Le Goff, X. Millet, J.M. Orgogozo, K. Peres, P. Barberger-Gateau, H. Jacqmin-Gadda, and J.F. Dartigues. Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms. *Ann Neurol* **2008**.64:492-8.

ANAES. Recommandations professionnelles: Diagnostic et prise en charge de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées **2008**.www.has-sante.fr.

Ballatore, C., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **2007**.8:663-72.

Barthel, H., H.J. Gertz, S. Dresel, O. Peters, P. Bartenstein, K. Buerger, F. Hiemeyer, S.M. Wittemer-Rump, J. Seibyl, C. Reininger, and O. Sabri. Cerebral amyloid-beta PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol* **2011**.10:424-35.

Bennett, D.A., J.A. Schneider, Y. Tang, S.E. Arnold, and R.S. Wilson. The effect of social networks on the relation between Alzheimer's disease pathology and level of cognitive function in old people: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol* **2006**.5:406-12.

Berr, C., J.C. Lambert, V. Sazdovitch, P. Amouyel, M.C. Chartier-Harlin, M. Mohr, N. Heldt, M. Kiesmann, and J.J. Hauw. Neuropathological epidemiology of cerebral aging: a study of two genetic polymorphisms. *Neurobiol Aging* **2001**.22:227-35.

Biessels, G.J., S. Staekenborg, E. Brunner, C. Brayne, and P. Scheltens. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* **2006**.5:64-74.

Billings, L.M., S. Oddo, K.N. Green, J.L. McGaugh, and F.M. LaFerla. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **2005**.45:675-88.

Binder, L.I., A. Frankfurter, and L.I. Rebhun. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **1985**.101:1371-8.

Binder, L.I., A.L. Guillozet-Bongaarts, F. Garcia-Sierra, and R.W. Berry. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2005**.1739:216-23.

Blennow, K. CSF biomarkers for mild cognitive impairment. *J Intern Med* **2004**.256:224-34.

Bond, J., C. Stave, A. Sganga, B. O'Connell, and R.L. Stanley. Inequalities in dementia care across Europe: key findings of the Facing Dementia Survey. *Int J Clin Pract Suppl* **2005**.8-14.

Bons, N., F. Rieger, D. Prudhomme, A. Fisher, and K.H. Krause. Microcebus murinus: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav* **2006**.5:120-30.

Borchelt, D.R., T. Ratovitski, J. van Lare, M.K. Lee, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, D.L. Price, and S.S. Sisodia. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **1997**.19:939-45.

Braak, H., and E. Braak. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **1991**.82:239-59.

Brandt, R., M. Hundelt, and N. Shahani. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta* **2005**.1739:331-54.

Brion, J.P., A.M. Couck, E. Passareiro, and J. Flament-Durand. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* **1985**.17:89-96.

Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and H.M. Arrighi. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **2007**.3:186-91.

Brousseau, T., S. Legrain, C. Berr, V. Gourlet, O. Vidal, and P. Amouyel. Confirmation of the epsilon 4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* **1994**.44:342-4.

Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, and P.R. Hof. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **2000**.33:95-130.

Burdick, D., J. Kosmoski, M.F. Knauer, and C.G. Glabe. Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res* **1997**.746:275-84.

Bushlin, I., R.S. Petralia, F. Wu, A. Harel, M.R. Mughal, M.P. Mattson, and P.J. Yao. Clathrin assembly protein AP180 and CALM differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons. *J Neurosci* **2008**.28:10257-71.

Campion, D., C. Dumanchin, D. Hannequin, B. Dubois, S. Belliard, M. Puel, C. Thomas-Anterion, A. Michon, C. Martin, F. Charbonnier, G. Raux, A. Camuzat, C. Penet, V. Mesnage, M. Martinez, F. Clerget-Darpoux, A. Brice, and T. Frebourg. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* **1999**.65:664-70.

Casadesus, G., R.K. Rolston, K.M. Webber, C.S. Atwood, R.L. Bowen, G. Perry, M.A. Smith, C. Qiu, B. Winblad, L. Fratiglioni, J.A. Luchsinger, R. Mayeux, E.B. Larson, M.F. Shadlen, L. Wang, W.C. McCormick, J.D. Bowen, L. Teri, W.A. Kukull, H. Petrovitch, L.R. White, G. Izmirilian, G.W. Ross, R.J. Havlik, W. Markesbery, J. Nelson, D.G. Davis, J. Hardman, D.J. Foley, and L.J. Launer. Menopause, estrogen, and gonadotropins in Alzheimer's disease. *Adv Clin Chem* **2008**.45:139-53.

Cecillon, S., A.W. Coleman, A. Eveno-Nobile, P. H., and M. Rodrigue. Brevet. *PCT Int. Pat.* **2007**.WO 2007010110.

Checler, F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **1995**.65:1431-44.

Chetelat, G., and J.C. Baron. Early diagnosis of Alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging. *Neuroimage* **2003**.18:525-41.

Chetelat, G., B. Desgranges, and F. Eustache. [Brain profile of hypometabolism in early Alzheimer's disease: relationships with cognitive deficits and atrophy]. *Rev Neurol (Paris)* **2006**.162:945-51.

Chetelat, G., B. Desgranges, V. de la Sayette, F. Viader, K. Berkouk, B. Landeau, C. Lalevee, F. Le Doze, B. Dupuy, D. Hannequin, J.C. Baron, and F. Eustache. Dissociating atrophy and hypometabolism impact on episodic memory in mild cognitive impairment. *Brain* **2003**.126:1955-67.

Clark, C.M., J.A. Schneider, B.J. Bedell, T.G. Beach, W.B. Bilker, M.A. Mintun, M.J. Pontecorvo, F. Hefti, A.P. Carpenter, M.L. Flitter, M.J. Krautkramer, H.F. Kung, R.E. Coleman, P.M. Doraiswamy, A.S. Fleisher, M.N. Sabbagh, C.H. Sadowsky, E.P. Reiman, S.P. Zehntner, and D.M. Skovronsky. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *Jama* **2011**.305:275-83.

Coleman, A.W., F. Perret, A. Moussa, M. Dupin, Y. Guo, and H. Perron. Calix[n]arenes as Protein Sensors. *Topics in Current Chemistry* **2007**.277:31-88.

Coleman, A.W., S. Jebors, S. Cecillona, P. Perret, D. Garin, D. Marti-Battle, and M. Moulin. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New Journal of Chemistry* **2008**.32: 780-2

Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Jr., J.B. Rimmler, P.A. Locke, P.M. Conneally, K.E. Schmader, R.E. Tanzi, and et al. Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease. *Neurology* **1995**.45:1323-8.

Cras, P., M.A. Smith, P.L. Richey, S.L. Siedlak, P. Mulvihill, and G. Perry. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **1995**.89:291-5.

Crouch, P.J., S.M. Harding, A.R. White, J. Camakaris, A.I. Bush, and C.L. Masters. Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2008**.40:181-98.

Dahlgren, K.N., A.M. Manelli, W.B. Stine, Jr., L.K. Baker, G.A. Krafft, and M.J. LaDu. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* **2002**.277:32046-53.

De Felice, F.G., D. Wu, M.P. Lambert, S.J. Fernandez, P.T. Velasco, P.N. Lacor, E.H. Bigio, J. Jerecic, P.J. Acton, P.J. Shughrue, E. Chen-Dodson, G.G. Kinney, and W.L. Klein. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* **2008**.29:1334-47.

Delacourte, A., N. Sergeant, D. Champain, A. Wattez, C.A. Maurage, F. Lebert, F. Pasquier, and J.P. David. Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **2002**.59:398-407.

Delacourte, A., J.P. David, N. Sergeant, L. Buee, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghozali, C. Fallet-Bianco, F. Pasquier, F. Lebert, H. Petit, and C. Di Menza. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **1999**.52:1158-65.

Demetriades, A.K. Functional neuroimaging in Alzheimer's type dementia. *J Neurol Sci* **2002**.203-204:247-51.

Di Marino, V., Y. Etienne, and M. Niddam. Atlas photographique en couleur du système nerveux central **2010**.

Dickey, C.A., M. Yue, W.L. Lin, D.W. Dickson, J.H. Dunmore, W.C. Lee, C. Zehr, G. West, S. Cao, A.M. Clark, G.A. Caldwell, K.A. Caldwell, C. Eckman, C. Patterson, M. Hutton, and L. Petrucelli. Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. *J Neurosci* **2006**.26:6985-96.

Dougall, N.J., S. Bruggink, and K.P. Ebmeier. Systematic review of the diagnostic accuracy of 99mTc-HMPAO-SPECT in dementia. *Am J Geriatr Psychiatry* **2004**.12:554-70.

Dubey, M., P. Chaudhury, H. Kabiru, and T.B. Shea. Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell Motil Cytoskeleton* **2008**.65:89-99.

Dubois, B., H.H. Feldman, C. Jacova, S.T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P.J. Visser, and P. Scheltens. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **2007**.6:734-46.

Dubois, B., H.H. Feldman, C. Jacova, J.L. Cummings, S.T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N.C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G.A. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L.C. de Souza, Y. Stern, P.J. Visser, and P. Scheltens. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* **2010**.9:1118-27.

Duff, K., C. Eckman, C. Zehr, X. Yu, C.M. Prada, J. Perez-tur, M. Hutton, L. Buee, Y. Harigaya, D. Yager, D. Morgan, M.N. Gordon, L. Holcomb, L. Refolo, B. Zenk, J. Hardy, and S. Younkin. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* **1996**.383:710-3.

Duyckaerts, C., and J.J. Hauw. Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol Aging* **1997**.18:362-9; discussion 389-92.

Duyckaerts, C., M.C. Potier, and B. Delatour. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **2008**.115:5-38.

Duyckaerts, C., J.J. Hauw, F. Piette, C. Rainsard, V. Poulain, P. Berthaux, and R. Escourolle. Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol* **1985**.66:72-4.

Edbauer, D., E. Winkler, J.T. Regula, B. Pesold, H. Steiner, and C. Haass. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **2003**.5:486-8.

Engler, H., A. Forsberg, O. Almkvist, G. Blomquist, E. Larsson, I. Savitcheva, A. Wall, A. Ringheim, B. Langstrom, and A. Nordberg. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **2006**.129:2856-66.

Fabrigoule, C. Do leisure activities protect against Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* **2002**.1:11.

Farrer, L.A., L.A. Cupples, J.L. Haines, B. Hyman, W.A. Kukull, R. Mayeux, R.H. Myers, M.A. Pericak-Vance, N. Risch, and C.M. van Duijn. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* **1997**.278:1349-56.

Fasulo, L., G. Ugolini, M. Visintin, A. Bradbury, C. Brancolini, V. Verzillo, M. Novak, and A. Cattaneo. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* **2000**.75:624-33.

Ferri, C.P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, and M. Scazufca. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **2005**.366:2112-7.

Filippi, M., and F. Agosta. Structural and functional network connectivity breakdown in Alzheimer's disease studied with magnetic resonance imaging techniques. *J Alzheimers Dis* **2010**.24:455-74.

Finder, V.H., and R. Glockshuber. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* **2007**.4:13-27.

Fodero-Tavoletti, M.T., N. Okamura, S. Furumoto, R.S. Mulligan, A.R. Connor, C.A. McLean, D. Cao, A. Rigopoulos, G.A. Cartwright, G. O'Keefe, S. Gong, P.A. Adlard, K.J. Barnham, C.C. Rowe, C.L. Masters, Y. Kudo, R. Cappai, K. Yanai, and V.L. Villemagne. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* **2011**.134:1089-100.

Fratiglioni, L., S. Paillard-Borg, and B. Winblad. An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol* **2004**.3:343-53.

Fratiglioni, L., L.J. Launer, K. Andersen, M.M. Breteler, J.R. Copeland, J.F. Dartigues, A. Lobo, J. Martinez-Lage, H. Soininen, and A. Hofman. Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* **2000**.54:S10-5.

Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie, and et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* **1995**.373:523-7.

Garin, D., F. Oukhatar, A.B. Mahon, A.C. Try, M. Dubois-Dauphin, F.M. Laferla, M. Demeunynck, M.M. Sallanon, and S. Chierici. Proflavine derivatives as fluorescent imaging agents of amyloid deposits. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**.21:2203-6.

Glenner, G.G., and C.W. Wong. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **1984**.120:885-90.

Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**.349:704-6.

Goedert, M., C.M. Wischik, R.A. Crowther, J.E. Walker, and A. Klug. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**.85:4051-5.

Gray, H. Gray's Anatomy of the Human Body **1918**.

Grignon, Y., C. Duyckaerts, M. Bennecib, and J.J. Hauw. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **1998**.95:395-406.

Haass, C., and D.J. Selkoe. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* **1993**.75:1039-42.

Haass, C., and D.J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**.8:101-12.

Hansson, O., H. Zetterberg, P. Buchhave, E. Londos, K. Blennow, and L. Minthon. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **2006**.5:228-34.

Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **1997**.20:154-9.

Hardy, J.A., and G.A. Higgins. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**.256:184-5.

Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A.R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M.K. Lupton, C. Brayne, D.C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K.S. Brown, P.A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A.D. Smith, S. Love, P.G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A.M. Goate, J.S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J.C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P.P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N.J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C.E. Shaw, M. Tsolaki, A.B. Singleton, R. Guerreiro, T.W. Muhleisen, M.M. Nothen, S. Moebus, K.H. Jockel, N. Klopp, H.E. Wichmann, M.M. Carrasquillo, V.S. Pankratz, S.G. Younkin, P.A. Holmans, M. O'Donovan, M.J. Owen, and J. Williams. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **2009**.41:1088-93.

Herholz, K., and K. Ebmeier. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2011**.10:667-70.

Horowitz, P.M., K.R. Patterson, A.L. Guillozet-Bongaarts, M.R. Reynolds, C.A. Carroll, S.T. Weintraub, D.A. Bennett, V.L. Cryns, R.W. Berry, and L.I. Binder. Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **2004**.24:7895-902.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang, and G. Cole. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **1996**.274:99-102.

Ikonomovic, M.D., W.E. Klunk, E.E. Abrahamson, C.A. Mathis, J.C. Price, N.D. Tsopelas, B.J. Lopresti, S. Ziolko, W. Bi, W.R. Paljug, M.L. Debnath, C.E. Hope, B.A. Isanski, R.L. Hamilton, and S.T. DeKosky. Post-mortem correlates of in vivo PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain* **2008**.131:1630-45.

Inoue, S. In situ Abeta pores in AD brain are cylindrical assembly of Abeta protofilaments. *Amyloid* **2008**.15:223-33.

INSERM. Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux **2007**.

Ittner, L.M., and J. Gotz. Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2011**.12:65-72.

Jagust, W., A. Gitcho, F. Sun, B. Kuczynski, D. Mungas, and M. Haan. Brain imaging evidence of preclinical Alzheimer's disease in normal aging. *Ann Neurol* **2006**.59:673-81.

Jagust, W., R. Thisted, M.D. Devous, Sr., R. Van Heertum, H. Mayberg, K. Jobst, A.D. Smith, and N. Borys. SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical-pathologic study. *Neurology* **2001**.56:950-6.

Juan, D., D.H. Zhou, J. Li, J.Y. Wang, C. Gao, and M. Chen. A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur J Neurol* **2004**.11:277-82.

Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **1987**.325:733-6.

Kantarci, K., R.C. Petersen, B.F. Boeve, D.S. Knopman, S.D. Weigand, P.C. O'Brien, M.M. Shiung, G.E. Smith, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, and C.R. Jack, Jr. DWI predicts future progression to Alzheimer disease in amnestic mild cognitive impairment. *Neurology* **2005**.64:902-4.

Klunk, W.E., C.A. Mathis, J.C. Price, B.J. Lopresti, and S.T. DeKosky. Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **2006**.129:2805-7.

Knopman, D.S., S.T. DeKosky, J.L. Cummings, H. Chui, J. Corey-Bloom, N. Relkin, G.W. Small, B. Miller, and J.C. Stevens. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **2001**.56:1143-53.

Koffie, R.M., M. Meyer-Luehmann, T. Hashimoto, K.W. Adams, M.L. Mielke, M. Garcia-Alloza, K.D. Micheva, S.J. Smith, M.L. Kim, V.M. Lee, B.T. Hyman, and T.L. Spires-Jones. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**.106:4012-7.

Kogure, D., H. Matsuda, T. Ohnishi, T. Asada, M. Uno, T. Kunihiro, S. Nakano, and M. Takasaki. Longitudinal evaluation of early Alzheimer's disease using brain perfusion SPECT. *J Nucl Med* **2000**.41:1155-62.

Kopf, D., and L. Frolich. Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers Dis* **2009**.16:677-85.

Kraepelin, E. Das senile und prasenile Irresein. *Psychiatrie, ein Lehrbuch fur Studierende und Arzte* **1910**.593-632.

Kung, M.P., C. Hou, Z.P. Zhuang, D. Skovronsky, and H.F. Kung. Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* **2004a**.1025:98-105.

Kung, M.P., C. Hou, Z.P. Zhuang, A.J. Cross, D.L. Maier, and H.F. Kung. Characterization of IMPY as a potential imaging agent for beta-amyloid plaques in double transgenic PSAPP mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2004b**.31:1136-45.

Kung, M.P., C. Hou, Z.P. Zhuang, B. Zhang, D. Skovronsky, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, and H.F. Kung. IMPY: an improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of beta-amyloid plaques. *Brain Res* **2002**.956:202-10.

Kuntner, C., A.L. Kesner, M. Bauer, R. Kremslehner, T. Wanek, M. Mandler, R. Karch, J. Stanek, T. Wolf, M. Muller, and O. Langer. Limitations of small animal PET imaging with [18F]FDDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol* **2009**.11:236-40.

LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **2007**.8:499-509.

Lambert, J.C., S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M.J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fievet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon, M.M. de Pancorbo, C. Lendon, C. Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossu, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanche, J.F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, and P. Amouyel. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **2009**.41:1094-9.

Larson, E.B., M.F. Shadlen, L. Wang, W.C. McCormick, J.D. Bowen, L. Teri, and W.A. Kukull. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med* **2004**.140:501-9.

Larson, E.B., L. Wang, J.D. Bowen, W.C. McCormick, L. Teri, P. Crane, and W. Kukull. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med* **2006**.144:73-81.

Lautenschlager, N.T., L.A. Cupples, V.S. Rao, S.A. Auerbach, R. Becker, J. Burke, H. Chui, R. Duara, E.J. Foley, S.L. Glatt, R.C. Green, R. Jones, H. Karlinsky, W.A. Kukull, A. Kurz, E.B. Larson, K. Martelli, A.D. Sadovnick, L. Volicer, S.C. Waring, J.H. Growdon, and L.A. Farrer. Risk of dementia among relatives of Alzheimer's disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? *Neurology* **1996**.46:641-50.

Le Bihan, D., J.F. Mangin, C. Poupon, C.A. Clark, S. Pappata, N. Molko, and H. Chabriat. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* **2001**.13:534-46.

Ledesma, M.D., P. Bonay, C. Colaco, and J. Avila. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* **1994**.269:21614-9.

Ledesma, M.D., M. Perez, C. Colaco, and J. Avila. Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **1998**.44:1111-6.

Lee, G., S.T. Newman, D.L. Gard, H. Band, and G. Panchamoorthy. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* **1998**.111 (Pt 21):3167-77.

Leissring, M.A., M.P. Murphy, T.R. Mead, Y. Akbari, M.C. Sugarman, M. Jannatipour, B. Anliker, U. Muller, P. Saftig, B. De Strooper, M.S. Wolfe, T.E. Golde, and F.M. LaFerla. A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**.99:4697-702.

Leonard, J.P., D.P. Nowotnik, and R.D. Neirinckx. Technetium-99m-d, 1-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT--a comparison with iodine-123 HIPDM. *J Nucl Med* **1986**.27:1819-23.

Letenneur, L. Risk of dementia and alcohol and wine consumption: a review of recent results. *Biol Res* **2004**.37:189-93.

Letenneur, L., L.J. Launer, K. Andersen, M.E. Dewey, A. Ott, J.R. Copeland, J.F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, M. Baldereschi, C. Brayne, A. Lobo, J.M. Martinez-Lage, T. Stijnen, and A. Hofman. Education and the risk for Alzheimer's disease: sex makes a difference. EURODEM pooled analyses. EURODEM Incidence Research Group. *Am J Epidemiol* **2000**.151:1064-71.

Liu, F., T. Zaidi, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, R.K. Merkle, and C.X. Gong. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* **2002**.512:101-6.

Liu, F., B. Li, E.J. Tung, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, and C.X. Gong. Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci* **2007**.26:3429-36.

Lobo, A., L.J. Launer, L. Fratiglioni, K. Andersen, A. Di Carlo, M.M. Breteler, J.R. Copeland, J.F. Dartigues, C. Jagger, J. Martinez-Lage, H. Soininen, and A. Hofman. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* **2000**.54:S4-9.

Luchsinger, J.A., and R. Mayeux. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep* **2004**.6:261-6.

Lue, L.F., Y.M. Kuo, A.E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J.H. Kurth, R.E. Rydel, and J. Rogers. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **1999**.155:853-62.

Luo, F., N.R. Rustay, U. Ebert, V.P. Hradil, T.B. Cole, D.A. Llano, S.R. Mudd, Y. Zhang, G.B. Fox, and M. Day. Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **2010**.

Manetto, V., G. Perry, M. Tabaton, P. Mulvihill, V.A. Fried, H.T. Smith, P. Gambetti, and L. Autilio-Gambetti. Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments characteristic of neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**.85:4501-5.

Mathis, C.A., Y. Wang, D.P. Holt, G.F. Huang, M.L. Debnath, and W.E. Klunk. Synthesis and evaluation of 11C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* **2003**.46:2740-54.

Mattson, M.P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* **1997**.77:1081-132.

McGeer, P.L., and E.G. McGeer. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **2001**.22:799-809.

McGowan, E., J. Eriksen, and M. Hutton. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* **2006**.22:281-9.

McLean, C.A., R.A. Cherny, F.W. Fraser, S.J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, and C.L. Masters. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **1999**.46:860-6.

Meraz-Rios, M.A., K.I. Lira-De Leon, V. Campos-Pena, M.A. De Anda-Hernandez, and R. Mena-Lopez. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **2010**.112:1353-67.

Mosconi, L. Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2005**.32:486-510.

Mosconi, L., M. Brys, L. Glodzik-Sobanska, S. De Santi, H. Rusinek, and M.J. de Leon. Early detection of Alzheimer's disease using neuroimaging. *Exp Gerontol* **2007**.42:129-38.

Mosconi, L., V. Berti, R.H. Swerdlow, A. Pupi, R. Duara, and M. de Leon. Maternal transmission of Alzheimer's disease: prodromal metabolic phenotype and the search for genes. *Hum Genomics* **2010**.4:170-93.

Nagy, Z., M.M. Esiri, K.A. Jobst, J.H. Morris, E.M. King, B. McDonald, S. Litchfield, A. Smith, L. Barnetson, and A.D. Smith. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia* **1995**.6:21-31.

Najlerahim, A., and D.M. Bowen. Regional weight loss of the cerebral cortex and some subcortical nuclei in senile dementia of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* **1988**.75:509-12.

Namba, Y., M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo, and K. Ikeda. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res* **1991**.541:163-6.

Neve, R.L., D.J. Selkoe, D.M. Kurnit, and K.S. Kosik. A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res* **1986**.387:193-6.

Newberg, A.B., N.A. Wintering, K. Plossl, J. Hochold, M.G. Stabin, M. Watson, D. Skovronsky, C.M. Clark, M.P. Kung, and H.F. Kung. Safety, biodistribution, and dosimetry of 123I-IMPY: a novel amyloid plaque-imaging agent for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* **2006**.47:748-54.

Nicholson, R.M., Y. Kusne, L.A. Nowak, F.M. LaFerla, E.M. Reiman, and J. Valla. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res* **2010**.1347:179-85.

Oddo, S., V. Vasilevko, A. Caccamo, M. Kitazawa, D.H. Cribbs, and F.M. LaFerla. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **2006**.281:39413-23.

Oddo, S., A. Caccamo, J.D. Shepherd, M.P. Murphy, T.E. Golde, R. Kayed, R. Metherate, M.P. Mattson, Y. Akbari, and F.M. LaFerla. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **2003**.39:409-21.

Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé, and C. Gallez. La maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées **2005**.

Ono, K., M. Hirohata, and M. Yamada. Alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**.341:1046-52.

Ott, A., M.M. Breteler, F. van Harskamp, J.J. Claus, T.J. van der Cammen, D.E. Grobbee, and A. Hofman. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *Bmj* **1995**.310:970-3.

Ott, A., K. Andersen, M.E. Dewey, L. Letenneur, C. Brayne, J.R. Copeland, J.F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, A. Lobo, J.M. Martinez-Lage, T. Stijnen, A. Hofman, and L.J. Launer. Effect of smoking on global cognitive function in nondemented elderly. *Neurology* **2004**.62:920-4.

Panda, D., B.L. Goode, S.C. Feinstein, and L. Wilson. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* **1995**.34:11117-27.

Perret, F., A.N. Lazar, and A.W. Coleman. Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes. *Chem Commun (Camb)* **2006**.2425-38.

Petrovitch, H., L.R. White, G. Izmirilian, G.W. Ross, R.J. Havlik, W. Markesbery, J. Nelson, D.G. Davis, J. Hardman, D.J. Foley, and L.J. Launer. Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiol Aging* **2000**.21:57-62.

Poorkaj, P., T.D. Bird, E. Wijsman, E. Nemens, R.M. Garruto, L. Anderson, A. Andreadis, W.C. Wiederholt, M. Raskind, and G.D. Schellenberg. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* **1998**.43:815-25.

Qiu, C., B. Winblad, L. Fratiglioni, J.A. Luchsinger, and R. Mayeux. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia
Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2005**.4:487-99.

Querbes, O., F. Aubry, J. Pariente, J.A. Lotterie, J.F. Demonet, V. Duret, M. Puel, I. Berry, J.C. Fort, and P. Celsis. Early diagnosis of Alzheimer's disease using cortical thickness: impact of cognitive reserve. *Brain* **2009**.132:2036-47.

Querfurth, H.W., and F.M. LaFerla. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **2010**.362:329-44.

Raux, G., L. Guyant-Marechal, C. Martin, J. Bou, C. Penet, A. Brice, D. Hannequin, T. Frebourg, and D. Campion. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet* **2005**.42:793-5.

Read, S.L., B.L. Miller, I. Mena, R. Kim, H. Itabashi, and A. Darby. SPECT in dementia: clinical and pathological correlation. *J Am Geriatr Soc* **1995**.43:1243-7.

Regeur, L., G.B. Jensen, H. Pakkenberg, S.M. Evans, and B. Pakkenberg. No global neocortical nerve cell loss in brains from patients with senile dementia of Alzheimer's type. *Neurobiol Aging* **1994**.15:347-52.

Reiman, E.M., A. Uecker, F. Gonzalez-Lima, D. Minear, K. Chen, N.L. Callaway, J.D. Berndt, and D. Games. Tracking Alzheimer's disease in transgenic mice using fluorodeoxyglucose autoradiography. *Neuroreport* **2000**.11:987-91.

Reinhard, C., S.S. Hebert, and B. De Strooper. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *Embo J* **2005**.24:3996-4006.

Rocca, W.A., R.H. Cha, S.C. Waring, and E. Kokmen. Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from Rochester, Minnesota, 1975-1984. *Am J Epidemiol* **1998**.148:51-62.

Rogers, J., R. Li, D. Mastroeni, A. Grover, B. Leonard, G. Ahern, P. Cao, H. Kolody, L. Vedders, W.P. Kolb, and M. Sabbagh. Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiol Aging* **2006**.27:1733-9.

Roses, A.D., G. Einstein, J. Gilbert, M. Goedert, S.H. Han, D. Huang, C. Hulette, E. Masliah, M.A. Pericak-Vance, A.M. Saunders, D.E. Schmechel, W.J. Strittmatter, K.H. Weisgraber, and P.T. Xi. Morphological, biochemical, and genetic support for an apolipoprotein E effect on microtubular metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **1996**.777:146-57.

Sambamurti, K., A.C. Granholm, M.S. Kindy, N.R. Bhat, N.H. Greig, D.K. Lahiri, and J.E. Mintzer. Cholesterol and Alzheimer's disease: clinical and experimental models suggest interactions of different genetic, dietary and environmental risk factors. *Curr Drug Targets* **2004**.5:517-28.

Santacruz, K., J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton, and K.H. Ashe. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **2005**.309:476-81.

Savaskan, E., G. Olivieri, F. Meier, E. Seifritz, A. Wirz-Justice, and F. Muller-Spahn. Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity. *Gerontology* **2003**.49:380-3.

Scheff, S.W., S.T. DeKosky, and D.A. Price. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **1990**.11:29-37.

Selkoe, D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **1991**.6:487-98.

Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **2001**.81:741-66.

Semplicini, A., and L. Calo. Administering antihypertensive drugs after acute ischemic stroke: timing is everything. *Cmaj* **2005**.172:625-6.

Sergeant, N., A. Bretteville, M. Hamdane, M.L. Caillet-Boudin, P. Grognet, S. Bombois, D. Blum, A. Delacourte, F. Pasquier, E. Vanmechelen, S. Schraen-Maschke, and L. Buee. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* **2008**.5:207-24.

Shoghi-Jadid, K., G.W. Small, E.D. Agdeppa, V. Kepe, L.M. Ercoli, P. Siddarth, S. Read, N. Satyamurthy, A. Petric, S.C. Huang, and J.R. Barrio. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* **2002**.10:24-35.

Simic, G., I. Kostovic, B. Winblad, and N. Bogdanovic. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **1997**.379:482-94.

Sleegers, K., J.C. Lambert, L. Bertram, M. Cruts, P. Amouyel, and C. Van Broeckhoven. The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Genet* **2010**.26:84-93.

Small, G.W. What does imaging add to the management of Alzheimer's disease? *CNS Spectr* **2004**.9:20-3.

Small, G.W., V. Kepe, L.M. Ercoli, P. Siddarth, S.Y. Bookheimer, K.J. Miller, H. Lavretsky, A.C. Burggren, G.M. Cole, H.V. Vinters, P.M. Thompson, S.C. Huang, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, and J.R. Barrio. PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* **2006**.355:2652-63.

Sparks, D.L., M.N. Sabbagh, D.J. Connor, J. Lopez, L.J. Launer, S. Petanceska, P. Browne, D. Wassar, S. Johnson-Traver, J. Lochhead, and C. Ziolkowski. Atorvastatin therapy lowers circulating cholesterol but not free radical activity in advance of identifiable clinical benefit in the treatment of mild-to-moderate AD. *Curr Alzheimer Res* **2005**.2:343-53.

Spillantini, M.G., and M. Goedert. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* **1998**.21:428-33.

Steen, E., B.M. Terry, E.J. Rivera, J.L. Cannon, T.R. Neely, R. Tavares, X.J. Xu, J.R. Wands, and S.M. de la Monte. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* **2005**.7:63-80.

Suemoto, T., N. Okamura, T. Shiomitsu, M. Suzuki, H. Shimadzu, H. Akatsu, T. Yamamoto, Y. Kudo, and T. Sawada. In vivo labeling of amyloid with BF-108. *Neurosci Res* **2004**.48:65-74.

Sultana, R., M. Perluigi, and D.A. Butterfield. Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis. *Acta Neuropathol* **2009**.118:131-50.

Terry, R.D., E. Masliah, D.P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L.A. Hansen, and R. Katzman. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **1991**.30:572-80.

Touchon, J., and F. Portet. La maladie d'Alzheimer **2004**.

Tyas, S.L., R.B. Tate, K. Wooldrage, J. Manfreda, and L.A. Strain. Estimating the incidence of dementia: the impact of adjusting for subject attrition using health care utilization data. *Ann Epidemiol* **2006**.16:477-84.

Ukraintseva, S., F. Sloan, K. Arbeev, and A. Yashin. Increasing rates of dementia at time of declining mortality from stroke. *Stroke* **2006**.37:1155-9.

Valla, J., F. Gonzalez-Lima, and E.M. Reiman. FDG autoradiography reveals developmental and pathological effects of mutant amyloid in PDAPP transgenic mice. *Int J Dev Neurosci* **2008**.26:253-8.

Van Dam, D., and P.P. De Deyn. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **2010**.164:1285-300.

Vandenberghe, R., K. Van Laere, A. Ivanoiu, E. Salmon, C. Bastin, E. Triau, S. Hasselbalch, I. Law, A. Andersen, A. Korner, L. Minthon, G. Garraux, N. Nelissen, G. Bormans, C. Buckley, R. Owenius, L. Thurfjell, G. Farrar, and D.J. Brooks. 18F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol* **2010**.68:319-29.

Vingtdeux, V., U. Dreses-Werringloer, H. Zhao, P. Davies, and P. Marambaud. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* **2008**.9 Suppl 2:S6.

Vlasenko, A., M.C. Petit-Taboue, G. Bouvard, R. Morello, and J.M. Derlon. Comparative quantitation of cerebral blood volume: SPECT versus PET. *J Nucl Med* **1997**.38:919-24.

Wang, J.Z., and F. Liu. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* **2008**.85:148-75.

Wang, L., E.B. Larson, J.D. Bowen, and G. van Belle. Performance-based physical function and future dementia in older people. *Arch Intern Med* **2006**.166:1115-20.

Weuve, J., J.H. Kang, J.E. Manson, M.M. Breteler, J.H. Ware, and F. Grodstein. Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *Jama* **2004**.292:1454-61.

Whitwell, J.L., K.A. Josephs, M.E. Murray, K. Kantarci, S.A. Przybelski, S.D. Weigand, P. Vemuri, M.L. Senjem, J.E. Parisi, D.S. Knopman, B.F. Boeve, R.C. Petersen, D.W. Dickson, and C.R. Jack, Jr. MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* **2008**.71:743-9.

Williams, A.D., E. Portelius, I. Kheterpal, J.T. Guo, K.D. Cook, Y. Xu, and R. Wetzel. Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J Mol Biol* **2004**.335:833-42.

Wimo, A., B. Winblad, H. Aguero-Torres, and E. von Strauss. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **2003**.17:63-7.

Wyss-Coray, T., and L. Mucke. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* **2002**.35:419-32.

Ziolko, S.K., L.A. Weissfeld, W.E. Klunk, C.A. Mathis, J.A. Hoge, B.J. Lopresti, S.T. DeKosky, and J.C. Price. Evaluation of voxel-based methods for the statistical analysis of PIB PET amyloid imaging studies in Alzheimer's disease. *Neuroimage* **2006**.33:94-102.

Etudes biologiques de nouveaux radiotraceurs pour l'imagerie moléculaire de la maladie d'Alzheimer

Résumé : La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative s'exprimant par des troubles de la mémoire et un déclin cognitif évoluant progressivement vers un stade de démence incurable. Elle représente la cause principale de syndrome démentiel puisque l'on estime qu'elle est à l'origine de plus de 70% des cas de démences. Du fait de sa prévalence élevée après 60 ans, la MA représente un problème majeur de santé publique.
La MA se caractérise par la présence de deux types de lésions cérébrales : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes. Cependant, aucun consensus clair ne se dégage concernant les relations qui lient les deux types de lésions. Leur présence ne peut être mise en évidence que par un examen *post-mortem*. La MA est par définition une pathologie évolutive, cet examen ne permet donc pas de caractériser de manière adéquate les processus dynamiques qui sous-tendent cette pathologie.
La mise au point de techniques d'imagerie non invasives permettant de réaliser un suivi longitudinal *in vivo* de ces lésions s'avère déterminante dans la compréhension de la physiopathologie de la MA.
Les travaux effectués au cours de cette thèse ont pour objectif la mise au point de nouveaux radiotraceurs des lésions amyloïdes et neurofibrillaires pour l'imagerie nucléaire. Cette approche se distingue en trois parties. Dans un premier temps, nous avons validé un modèle animal de la MA: les souris transgéniques 3xTgAD. Dans un second temps, nous avons réalisé l'évaluation biologique de différents radiotraceurs connus sur ce modèle animal : le ^{99m}Tc-HMPAO, le ^{18}F-FDG et le ^{125}I-IMPY. Enfin, nous avons initié le développement de plusieurs nouveaux traceurs pour permettre le suivi de la MA *in vivo* : les para-sulfonato-calixarènes qui présentent une affinité intéressante pour les plaques amyloïdes, les composés COB qui inhibent la formation des agrégats de peptides amyloïdes *in vitro* ainsi qu'un peptide, A93, associé à un vecteur qui pourrait interagir avec les dégénérescences neurofibrillaires.

Mots clés : Imagerie nucléaire, Dégénérescences neurofibrillaires, Plaques amyloïdes, souris 3xTgAD

Biological studies of new radiotracers for molecular imaging of Alzheimer's disease

Summary : Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology showing cognitive and memory disorders which progress toward an incurable demential state. AD represents the principle cause of the dementia syndrome and it is estimated that AD is involved in 70% of dementia cases. AD prevalence is high in the over 60 years old population. This elevated prevalence is associated with an increasing number of elderly people. AD is therefore a major public health concern.
AD is characterized by two types of specific cerebral lesions: neurofibrillary tangles (NFT) and amyloid plaques. However, there is no consensus on the links between these two types of lesions. To date, their presence can only be evaluated by a post-mortem examination. AD being a progressive pathology, this examination cannot be used to fully characterize the dynamic processes involved in AD.
In this context, the development of non invasive imaging techniques to monitor the lesions progression in vivo could be determinant in AD pathophysiology understanding.
Our objective is to develop new tracers of amyloid and neurofibrillary lesions for nuclear imaging. The first part of this study was dedicated to the validatation of an AD animal model: Transgenic 3xTgAD mice. The second part of this thesis focuses on the appreciatiation of the biological comportement of several known radiotracers of AD on this animal model. In the third part of this work, we initiate the development of several new tracers of AD-specific lesions. The para-sulfonato-calixarenes and the COB compounds for amyloid plaques detection and a peptide named A93, associated to a vector for the study of neurofibrillary tangles.

Keywords : Nuclear imaging, Neurofibrillary tangles, Amyloid plaques, 3xTgAD mice