



**HAL**  
open science

# Conséquences de l'invalidation génétique et pharmacologique des récepteurs adénoenergiques A2A dans un modèle de pathologie Tau. Relation avec les aspects neuro-inflammatoires

Cyril Laurent

► **To cite this version:**

Cyril Laurent. Conséquences de l'invalidation génétique et pharmacologique des récepteurs adénoenergiques A2A dans un modèle de pathologie Tau. Relation avec les aspects neuro-inflammatoires. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S041 . tel-01141735

**HAL Id: tel-01141735**

**<https://theses.hal.science/tel-01141735>**

Submitted on 13 Apr 2015

**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 LILLE - NORD DE FRANCE  
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2**

**École Doctorale Biologie-Santé (ED446)**

**THÈSE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2**

Spécialité : neurosciences

Présentée par

**Cyril LAURENT**

---

**Conséquences de l'invalidation génétique et  
pharmacologique des récepteurs  $A_{2A}$  dans un modèle de  
pathologie Tau.  
Relation avec les aspects neuro-inflammatoires.**

---

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2013 devant le Jury composé de :

**Mme le Dr. Astrid NEHLIG  
M. le Dr. Stéphane Hunot  
Mme le Dr. Luisa V LOPES  
M. le Dr. Guillaume DOROTHÉE  
M. le Dr. Luc BUÉE  
M. le Dr. David BLUM**

**Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**



A mes parents, à Clément,



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres de mon jury, le **Dr. Astrid Nehlig**, le **Dr. Stéphane Hunot**, le **Dr. Luisa Lopes**, le **Dr. Guillaume Dorothee**, le **Dr. Luc Buée** et le **Dr. David Blum** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce travail. Je remercie particulièrement le **Dr. Astrid Nehlig** et le **Dr. Stéphane Hunot** pour avoir accepté de lire avec minutie mon manuscrit de thèse et d'évaluer le travail effectué durant ces trois années de doctorat.

Je remercie le **Pr. Pierre Formstecher** pour m'avoir hébergé au sein du centre de recherche Jean-Pierre Aubert et de l'Unité Inserm 837.

Je tiens à remercier le **Dr. Luc Buée** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche « Alzheimer & Tauopathies » depuis maintenant plus de quatre ans. Bien que constamment sollicité, et chargé de nombreuses responsabilités, vous avez su vous rendre disponible pour suivre l'avancée de mon travail de thèse. A titre d'exemple, je me rappelle bien évidemment d'une après midi où nous avons fait le choix ensemble de l'anticorps d'immunisation anti-CD3 à utiliser, et par la même de la prolongation de ma thèse :-). Toujours est-il qu'une réunion de travail à vos côtés est revigorante et très instructive. Un grand merci également pour vos conseils avisés et par votre aptitude à vous questionner en priorité sur l'épanouissement personnel, de voir l'intérêt de l'individu avant toute chose.

L'ampleur de mes remerciements va bien évidemment au **Dr. David Blum** pour m'avoir supporté pendant plus de quatre ans (ce qui est bien sur réciproque :-). Les relations entre un doctorant et son tuteur sont souvent de nature complexe, en ce qui me concerne ça a globalement été un grand plaisir, bien que difficile, d'être ton étudiant. En effet, au cours de ces longues années à tes côtés, j'ai pu profiter de ta grande rigueur et exigence tant d'un point de vue technique que scientifique. Tu es de plus toujours très disponible pour répondre à une question, pour un conseil, ce qui est très appréciable. Enfin tu as fait le maximum pour m'intégrer à de nombreux projets scientifiques très intéressants, me permettant au passage d'avoir un bon CV scientifique et pour cela je te remercie sincèrement. Un grand merci également pour m'avoir permis d'assister à différents congrès, notamment celui des neurosciences américaines à Washington, ou encore pour m'avoir fait participer à ce travail collaboratif à l'IMM de Lisbonne où j'ai pu m'introduire à l'électrophysiologie. Je te suis en tout cas très reconnaissant de m'avoir accordé ta confiance sur les différents aspects de cette aventure et d'avoir façonner mon esprit scientifique. Je suis tout de même ravi d'achever cette expérience professionnelle ne serait-ce que pour ne plus recevoir pléthore de mails par jour (enfin j'espère :-). Merci pour tout.

Je tiens à remercier le **Dr. Malika Hamdane** pour son extrême gentillesse et ses nombreux conseils avisés et idées pertinentes. Tu es constamment à l'écoute, rassurante et c'est particulièrement agréable dans certaines situations de doute. Tu as également très probablement tempéré les humeurs de David au cours de ces années et donc pour cela, merci beaucoup.

Merci également aux **Docteurs Valérie Buée-Scherrer, Marie-Laure Caillet-Boudin, Morvane Colin, Claire-Marie Dhaenens, Marie-Christine Galas, Sandrine Humez, Bruno Lefebvre, Bernard Sablonnière, Susanna Schraen et Nicolas Sergeant** pour leur soutien et leurs remarques pertinentes et constructives au cours des différentes réunions de laboratoires.

Je remercie l'ensemble des personnels de l'animalerie de JPARC. Je remercie tout particulièrement, **Ingrid, Delphine, Julien, Delphine, Mélanie, Yann et Christian** pour leur contribution dans l'hébergement et l'élevage des souris qui constituent la matière première de nos travaux.

Je remercie également **Nathalie Jouy et Emilie** pour m'avoir formé et donner de précieux conseils en cytométrie. Merci pour votre bonne humeur et votre grand professionnalisme.

Un très grand merci au personnel administratif de JPArC. Je pense tout particulièrement à **Sophie, Nathalie, Michèle et Céline** qui nous facilitent grandement la vie et qui font un travail remarquable même si nous ne nous en rendons pas souvent compte. Merci pour la bonne humeur qui caractérise votre bureau.

Merci **Sylvie** pour avoir accueilli le petit étudiant que j'étais il y a maintenant bien longtemps et pour m'avoir initié aux techniques de biochimie. Mon année de Master 2 à tes côtés a été un réel plaisir, très formatrice, et j'ai pu m'apercevoir de ce qu'était le travail de thèse grâce à la Blum-girl que tu es.

**Antoine**, que dire de toi. Nos relations ont été plutôt tumultueuses mais je garde de toi et de nos trois années de travail un excellent souvenir. Je te remercie grandement en tant que co-Blum guy et pour avoir réussi à me supporter comme colocataire à Lisbonne et comme voisin de bureau.

Merci à **Francisco, Maxime et Simon**. Il est toujours très plaisant de parler avec vous (pas toujours de manière très scientifique) car constamment de bonne humeur et c'est un réel plaisir de vous avoir comme partenaires au sein du laboratoire, dans des moments qui ne sont pas toujours évidents. Bon courage à vous pour la suite de cette aventure.

Un grand merci à **Nadège et Raphaëlle** pour leur aide précieuse en immunohistochimie, leur disponibilité et leur gentillesse.

Ah **Dominique**, ma petite maman poule. Que dire de toi si ce n'est que tu es très certainement la sexagénaire la plus joviale qu'il existe. Un énorme merci pour avoir couvé le petit piou-piou que je suis pendant ces longues années. Merci également pour ton aide technique très utile. Tu es quelqu'un que j'apprécie énormément et qui va beaucoup me manquer. J'espère avoir de tes nouvelles très régulièrement.

Ma chère **Séverine**. Merci d'être ce que tu es, c'est à dire une personne sincère et très professionnelle. Je dois dire qu'en arrivant au laboratoire, tu m'as fait très peur mais au fil des mois j'ai appris à te connaître et j'aime beaucoup la personne que tu es. Ne change surtout pas.

Oh **Sabihaaa**, j'arrive enfin au paragraphe qui te concerne. Tout d'abord un grand merci pour ton aide technique indispensable tant pour les aspects comportementaux que pour les électrophorèses bidimensionnelles. Je souhaite toutefois te remercier un grand nombre de fois pour avoir été une sorte de grande sœur pour moi au cours de ces années. Tu es d'une gentillesse sans limite, toujours à l'écoute, très sensible et à ce que l'on te dit et pleine de bon sens. Sans toi, les moments difficiles qui ont rythmé ma thèse auraient été bien plus pénibles.

Merci à **Méliza** pour sa bonne humeur et sa joie de vivre. Tu es un vrai rayon de soleil dans ce laboratoire et c'est un réel plaisir de te côtoyer chaque jour. Bonne continuation à toi.

Un grand merci également à **Hélène Obriot** pour son aide précieuse vis à vis des électrophorèses bidimensionnelles. Je suis ravi d'avoir pu partager le bureau avec toi, nous permettant souvent d'avoir des discussions très intéressantes. Tu es toi aussi quelqu'un d'extrêmement sympathique avec qui j'ai apprécié être.

**Vanessa**, je te souhaite bonne chance pour la suite. La thèse est une expérience certes difficile mais très enrichissante. Occupe toi bien de ton chef et suis les conseils qu'il te donnera, il a malheureusement souvent raison ;-).

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire qui rendent ou ont rendu notre cadre de travail agréable et sympathique : **Elodie, Meryem, Amélie, Vincent, Simon, Coline, Clément, Claire, Laëtitia, Katia, Hélène Le Freche, Jonathan, Marie-Lise, Fanny, Sophie Becque, Céline, Marie Basquin, Marie Violet, Alban, Anthony, Cedrick, Sébastien, Hélène Tran**, Je vous souhaite à tous une excellente continuation.

Enfin je remercie le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur pour avoir financé mes trois années de thèse.





## Résumé

Le vieillissement de la population est à l'origine de l'augmentation du nombre de personnes souffrant de démences, dont la plus fréquente est la maladie d'Alzheimer (MA). La MA est une maladie neurodégénérative incurable caractérisée par une atteinte progressive des fonctions cognitives, en premier lieu les fonctions mnésiques. Son diagnostic formel repose sur l'examen post-mortem du cerveau des patients. Il est basé sur la présence conjointe de deux lésions caractéristiques: des dépôts extracellulaires majoritairement composés de peptide amyloïde fibrillaire, résultat d'un clivage anormal du précurseur transmembranaire APP, et d'une dégénérescence neurofibrillaire ou pathologie tau, caractérisée par l'accumulation intra-neuronale de protéines tau hyper- et anormalement phosphorylées. Parallèlement à ces deux lésions se développe une réponse neuro-inflammatoire, notamment caractérisée par une augmentation du nombre et de l'activité des cellules microgliales et astrocytaires. Bien que les relations entre la pathologie amyloïde et la mise en place des processus neuro-inflammatoires aient fait l'objet d'intenses investigations, peu d'études se sont intéressées aux liens réciproques existants entre ces processus et la pathologie tau. A travers l'utilisation d'un modèle murin transgénique mimant le versant tau de la MA, la lignée THY-Tau22, un des objectifs de ma thèse a consisté à caractériser les différents aspects de leur réponse neuro-inflammatoire. Ces souris développent une pathologie tau hippocampique progressive associée à des altérations mnésiques. Les études transcriptomiques, biochimiques et histologiques réalisées ont mis en évidence une augmentation progressive de l'expression hippocampique de marqueurs de l'immunité innée mais également adaptative chez les souris THY-Tau22. Nous observons particulièrement l'établissement progressif de réactions microgliales et astrocytaires, une augmentation des niveaux de différentes chimiokines (CCL3, CCL4 et CCL5) conjointement à une infiltration parenchymateuse de lymphocytes T, en l'absence d'altération majeure de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Ces résultats mettent en exergue une corrélation entre le développement de troubles mnésiques et de la pathologie Tau hippocampique d'une part, et la présence d'une réponse neuro-inflammatoire d'autre part.

La MA est une maladie multifactorielle dont la survenue est modulée par différents facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux mis en évidence par les études épidémiologiques, la consommation de caféine réduit notablement le risque de développer la MA. La caféine est une substance psychoactive dont les effets sont essentiellement médiés par le blocage des récepteurs adénosinergiques  $A_1$  et  $A_{2A}$ , ces derniers étant particulièrement décrits pour moduler les processus neuroinflammatoires. Le rôle de ces récepteurs étant mal connus dans le contexte de la MA, et inconnu concernant ses relations à la pathologie Tau, la seconde partie de ma thèse a consisté à évaluer les effets de la caféine mais également d'un blocage spécifique des récepteurs  $A_{2A}$ , par des approches génétiques et pharmacologiques, vis-à-vis des altérations comportementales, de la pathologie tau et de la réponse neuro-inflammatoire dans le modèle THY-Tau22. Les résultats obtenus démontrent que la caféine et le blocage spécifique des récepteurs  $A_{2A}$  exercent des effets bénéfiques dans ce modèle de Tauopathie, avec une prévention des altérations mnésiques, une réduction de l'hyperphosphorylation de Tau et des effets anti-inflammatoires. Ces modifications sont associées à des effets bénéfiques en terme neurochimique et synaptique. L'ensemble de ces résultats démontrent pour la première fois un effet bénéfique de la caféine et du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  dans un modèle murin de tauopathie et suggèrent qu'un ciblage thérapeutique de ces récepteurs puisse être d'intérêt dans la MA.

## Abstract

Population ageing is a major risk factor for dementia, the most prevalent being Alzheimer disease (AD). AD is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive cognitive decline, notably impacting memory functions. Its formal diagnosis is based on the post-mortem examination of AD patients' brains and defined by the combination of two lesions: extracellular deposition of fibrillar amyloid peptide, resulting from the abnormal cleavage of transmembrane APP precursor, and neurofibrillary tangles, characterized by intraneuronal accumulation of hyper- and abnormal phosphorylated tau protein (Tau pathology). Besides these two lesions hallmarks, neuro-inflammatory processes, mainly defined by an increase of the number and the activity of microglial and astroglial cells, are considered as a third pathological component. Although the relationships between amyloid pathology and neuro-inflammatory processes had been the subject of intense investigations, few studies has been achieved with regards to tau pathology. As a first aim of this work, neuro-inflammatory processes associated with Tau pathology has been evaluated using a transgenic mouse model mimicking AD-like Tau pathology, THY-Tau22 strain.. These mice overexpress a mutated human tau protein under the control of a neuronal promoter and progressively hippocampal tau pathology associated to memory decline. Transcriptomic, biochemical and histological evaluations revealed a progressive increase several markers of both innate and adaptive immunity in the hippocampus of THY-Tau22 transgenic mice. We notably observed a progressive rise of microglial and astroglial reactions, the overproduction of many chemokines (CCL3, CCL4, CCL5) in association with a parenchymatous infiltration of T cells, without major disruption of blood brain barrier (BBB). These results highlight a correlation between the establishments of memory alterations and hippocampal tau pathology on the one hand, and the occurrence of a neuro-inflammatory response on the other hand.

AD is a multifactorial disorder whose occurrence depends on different genetic and environmental factors. Among the latter, epidemiological studies have shown that caffeine consumption significantly reduces the risk to develop AD. Caffeine is a psychoactive drug, whose effects are mainly ascribed to the blockade of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosinergic receptors, the latter being known to modulate neuro-inflammatory processes. The role of A<sub>2A</sub> receptors in AD is far from understood, and relationship with tau pathology currently unknown. The second part of my PhD aimed at evaluating effects of caffeine but also of a specific A<sub>2A</sub>R blockade, using genetic and pharmacological means, towards behavioural alterations, tau pathology and neuro-inflammatory processes in THY-Tau22 model. Results obtained demonstrate that caffeine and specific A<sub>2A</sub>R blockade lead to beneficial effects towards memory dysfunction, tau hyperphosphorylation and hippocampal neuro-inflammation. These improvements are associated with beneficial neurochemical and electrophysiological changes. Theses results demonstrate for the first time a beneficial effect of caffeine and A<sub>2A</sub> receptor blockade in a mouse model of tauopathy and support that therapeutic targeting of A<sub>2A</sub> receptors could be of interest in AD.



## Avant-propos

L'étude présentée dans ce manuscrit porte sur les conséquences du blocage des récepteurs adénoenergiques  $A_{2A}$  vis à vis de la pathologie tau, une des deux lésions histopathologiques qui caractérisent la maladie d'Alzheimer (MA). Le blocage de ces récepteurs a été réalisé au moyen de deux stratégies distinctes : la première consiste en une invalidation génétique globale des récepteurs  $A_{2A}$  dans un modèle murin transgénique mimant le versant tau de la MA (souris THY-Tau22), alors que la deuxième repose sur un traitement chronique de caféine de ces souris sur une période de 9 mois. La modulation des récepteurs  $A_{2A}$  est décrite comme ayant des conséquences sur les niveaux d'inflammation tant au niveau périphérique que centrale. En outre, la réponse neuro-inflammatoire présente dans le cerveau des patients atteints de la MA contribue à la progression des troubles mnésiques ainsi qu'à celle de la lésion tau. En ce sens, la neuro-inflammation sera largement détaillée au cours de ce manuscrit notamment au travers de la caractérisation du phénotype neuro-inflammatoire du modèle THY-Tau22. Afin que le lecteur dispose des outils nécessaires à la bonne compréhension des résultats expérimentaux, une partie introductive sera réalisée sur les principaux aspects neuro-inflammatoires décrits dans le contexte de la MA, une fois rappelées les bases cellulaires et moléculaires de la réponse neuro-inflammatoire. Les différents aspects de la MA ainsi que les facteurs génétiques et environnementaux conditionnant son apparition seront également détaillés. Enfin, les effets de la caféine et du blocage spécifique des récepteurs adénoenergiques  $A_{2A}$  seront décrits dans le contexte de la MA, après avoir rappelé les bases du système adénoenergique et les conséquences physiologiques d'une consommation habituelle de caféine.



# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : La Maladie d'Alzheimer</b>	<b>1</b>
1. Découverte de la MA	
2. Aspect Clinique	
3. Diagnostic	
4. Lésion neuropathologiques	
4.1. Atrophie Cérébrale	
4.2. Dépôts amyloïdes extracellulaires	
4.3. La dégénérescence neuro-fibrillaire	
4.3.1. Structure du gène et de la protéine Tau	
4.3.2. Modifications post-traductionnelles	
4.3.2.1. Phosphorylation	
4.3.2.1.1. Kinases	
4.3.2.1.2. Phosphatases	
4.3.2.2. Autres modifications post-traductionnelles	
4.3.3. Fonctions physiologiques de la protéine Tau	
4.3.3.1. Une protéine d'association aux microtubules	
4.3.3.2. Implication de la protéine Tau dans la signalisation cellulaire	
4.3.3.3. Une protéine nucléaire	
4.3.4. Dérégulation des fonctions physiologiques de tau et formation de la DNF	
4.3.4.1. Tau : une protéine hyper- et anormalement phosphorylée	
4.3.4.2. Perte de fonction physiologique	
4.3.4.3. Formation des agrégats de tau et gain de fonction toxique	
4.3.4.4. Propagation de la DNF	
<b>CHAPITRE 2 : Présentation générale du système immunitaire cérébral et des processus neuro-inflammatoires</b>	<b>17</b>
1. Aperçu du système neuro-immunitaire : implication de la microglie	
1.1. Origine des cellules microgliales	
1.2. Fonction de la microglie dans le cerveau sain	
1.2.1. Elimination des synapses extra-numéraires durant le développement post-natal	
1.2.2. Phagocytose des corps apoptotiques	
1.2.3. Plasticité synaptique	
1.2.4. Echantillonnage de l'environnement	
2. Les différentes composantes cellulaires de l'inflammation	
2.1. Activation microgliale	
2.2. Activation astrocytaire	
2.3. Infiltration lymphocytaire et sécrétion chémokinique	
2.3.1. Présentation des chémokines	
2.3.2. Aperçu du rôle physiologique exercé par les lymphocytes au niveau central	

### 2.3.3. Infiltration lymphocytaire

## **CHAPITRE 3 : Aspects neuro-inflammatoires de la maladie d'Alzheimer**

**28**

1. Aperçu du système neuro-immunitaire : implication de la microglie
  - 1.1. La microglie
    - 1.1.1. Mise en évidence d'une augmentation de l'activité microgliale
    - 1.1.2. Implication dans la clairance du peptide amyloïde
      - 1.1.2.1. Récepteurs microgliaux au peptide amyloïde
      - 1.1.2.2. Mise en évidence d'un dysfonctionnement de la phagocytose
  - 1.2. Les astrocytes
  - 1.3. Les neurones
  - 1.4. Les lymphocytes
    - 1.4.1. Mise en évidence d'une réponse lymphocytaire
    - 1.4.2. Lymphocytes et clairance du peptide amyloïde
    - 1.4.3. Mécanismes sous-jacents à l'infiltration lymphocytaire dans la MA
2. Composante moléculaire et relations physiopathologiques
  - 2.1. Cytokines
  - 2.2. Chémokines
3. Relations bidirectionnelles entre la neuro-inflammation et la pathologie tau
  - 3.1. La pathologie Tau induit une réponse neuro-inflammatoire
  - 3.2. Les conséquences délétères de l'inflammation sur la pathologie Tau

## **CHAPITRE 4 : La Maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle**

**40**

1. Facteurs génétiques
  - 1.1. Formes familiales de la MA
    - 1.1.1. Mutations sur le gène APP
    - 1.1.2. Mutations sur les gènes PSEN1 et PSEN2
  - 1.2. Formes sporadiques de la MA
    - 1.2.1. ApoE e4
    - 1.2.2. Autres facteurs génétiques
2. Facteurs environnementaux
  - 2.1. Facteurs de risque
    - 2.1.1. Syndrome métabolique
      - 2.1.1.1. Obésité
      - 2.1.1.2. Dyslipidémie
      - 2.1.1.3. Hypertension
    - 2.1.2. Diabète de type 2
  - 2.2. Facteurs protecteurs
    - 2.2.1. Stimulation environnementale
    - 2.2.2. Régime alimentaire

## **CHAPITRE 5 : Caféine et système adénoenergique dans le cerveau sain**

**51**

1. Historique
2. Source de caféine et consommation



3. Pharmacologie
  - 3.1. Pharmacocinétique, métabolisme et demi-vie
  - 3.2. Actions moléculaires
4. L'adénosine et ses récepteurs
  - 4.1. Métabolisme de l'adénosine
    - 4.1.1. Synthèse extracellulaire de l'adénosine
    - 4.1.2. Synthèse intracellulaire de l'adénosine
    - 4.1.3. Transport de l'adénosine et clairance extracellulaire
    - 4.1.4. Élimination de l'adénosine intracellulaire
  - 4.2. Récepteurs à l'adénosine
    - 4.2.1. Présentation et distribution cérébrale
    - 4.2.2. Implication dans la plasticité synaptique
5. Actions centrales de la caféine
  - 5.1. Performances cognitives
    - 5.1.1. Mémoire et apprentissage
    - 5.1.2. Apprentissage et vivacité intellectuelle
    - 5.1.3. Performance cognitives et fatigue
  - 5.2. Sommeil
  - 5.3. Effets psychomoteurs

**CHAPITRE 6 : Caféine, récepteurs adénoenergiques et maladie d'Alzheimer 66**

1. Effets de la caféine sur le déclin cognitif
  - 1.1. Au cours du vieillissement normal
  - 1.2. Au cours de la maladie d'Alzheimer
2. Les récepteurs adénoenergiques comme cible thérapeutique de la MA
  - 2.1. Apport de la caféine
  - 2.2. Effets du blocage ciblé des récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> sur la physiopathologie de la MA
    - 2.2.1. Récepteurs A<sub>1</sub>
    - 2.2.2. Récepteurs A<sub>2A</sub>
      - 2.2.2.1. Mécanismes neuronaux
      - 2.2.2.2. Mécanismes non neuronaux
3. Modulation de la pathologie Tau

**OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 76**

**RESULTATS 84**

**Partie 1 : Caractérisation de la réponse neuro-inflammatoire des souris THY-Tau22 86**

**Partie 2 : Effets d'une consommation chronique de caféine chez les souris THY-Tau22 115**

<b>Partie 3 : Conséquences de l'invalidation génétique des récepteurs A2A dans le modèle THY-Tau22</b>	<b>149</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>174</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>184</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>228</b>



## Abbreviations

A <sub>2A</sub>	Récepteurs adénoenergiques de type 2A
ABCA7	ATP-binding cassette sub-family A member 7
ADA	Adénosine déaminase
ADK	Adénosine kinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt/PKB	Protéine kinase B
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
APP	Amyloid precursor protein
ARN	Acide ribonucléique
ATXN1	Ataxin-1
A $\beta$	Amyloïde beta
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BIN1	Bridging integrator 1
CA	Corne d'Ammon
CCL2, 3, 4, 5	Chemokine (C-C motif) ligand 2, 3, 4, 5
CD	Cluster de différenciation
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	Calcium/Calmodulin dependent kinase
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
CD2AP	CD2-associated protein
Clec7a	C-type lectin domain family 7 member A
CLU	Clusterine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cox-2	Cyclo-oxygénase2
CR1	Complement Receptor 1
CXCL5	C-X-C motif chemokine 5
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
EPHA1	Ephrin type A receptor 1
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
FTDP-17	Démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
G272V	Glycine-272-Valine
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogénase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSK-3 $\beta$	Glycogen-synthase kinase 3 beta
hTau	human Tau
H2AB-1	Histocompatibility 2, class II antigen 1, beta 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecular 1
IFN	Interféron
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulines G
IL1, 4	Interleukine-1, 4
Itgax	Integrin alpha X

KO	Knock out
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	Potentialisation à long terme
LTD	Dépression à long terme
MA	Maladie d'Alzheimer
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPT	Microtubule associated protein
MnSOD	Manganèse superoxide dismutases
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NeuN	Neuronal Nuclei
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
i/eNOS	inductible/ endothélial Nitric oxyde synthase
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
P301S	Proline-301-Sérine
PGE2	Prostaglandine E2
PHF	Paired helical filaments
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PP (1, 2A, 2B, 5)	Protéine Phosphatase
PSEN (1 ou 2)	Préséniline
R (1 à 4)	Domaine de répétition
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SH3	Src homology 3
Slamf9	Signaling lymphocytic activation molecule
SNC	Système nerveux central
SORL1	Sortilin-related receptor, L (DLR class) A repeat containing
TEP	Tomographie à émission de position
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TREM	Trigerring receptor expressed on myeloid cells
WT	Wild type, sauvage
VCAM	Vascular cell adhesion protein 1
VLA-4	Very-late antigen-4
Y/Tyr	Tyrosine
ZO-1	Zonula Occludens-1



# Introduction





# Chapitre 1 : La Maladie d'Alzheimer

La détérioration des facultés intellectuelles est un processus normal du vieillissement qui se traduit généralement par des pertes de mémoire. Ces altérations peuvent être beaucoup plus marquées et donner naissance à des troubles cognitifs sévères, on parle alors de démences dont la cause principale est à ce jour la maladie d'Alzheimer (MA).

## 1. Découverte de la MA

Le 25 novembre 1901, la patiente Auguste Deter est admise à l'hôpital de Frankfort en raison de désordres cognitifs, de paranoïa, d'hallucinations et de troubles comportementaux et psychosociaux. Le psychiatre et neurologue allemand Aloïs Alzheimer la prend en charge et suspecte un cas de démence sénile bien qu'incompatible avec le relatif jeune âge de la patiente (51ans). Au cours de son suivi, il observe la perte progressive de ses fonctions cognitives et de son autonomie. A sa mort, le 8 avril 1906, il procède à l'examen de son cerveau et y met en évidence la présence de plaques séniles extracellulaires et d'une dégénérescence neurofibrillaire (Figure 1). Ses observations sont présentées durant la 37<sup>ème</sup> conférence des psychiatres allemands, le 4 novembre 1906 à Tübingen. Plusieurs médecins (Fisher, Bonfiglio, Perusini) réétudient le cerveau d'Auguste Deter et confirment la découverte d'Alzheimer. L'étude de ce cas a permis d'établir une corrélation entre la présence de lésions neuropathologiques et les atteintes cognitives et psychiatriques caractérisant la maladie, qui prendra alors le nom de son investigateur (Maurer et al., 1997).



*Figure 1 Dégénérescence neurofibrillaire intra-neuronale de la patiente Auguste D. dessinée par Aloïs Alzheimer.*

## 2. Aspect clinique

La MA est une maladie neurodégénérative caractérisée par une progression stéréotypée des troubles cognitifs. La première manifestation clinique est une atteinte de la mémoire épisodique qui se traduit chez le patient par des difficultés à se souvenir des faits récemment appris ou à acquérir de nouvelles informations. Ces pertes de mémoire, résultat d'une atteinte neurologique de l'hippocampe, s'accroissent avec la progression de la maladie. D'autres déficits cognitifs apparaissent ensuite en raison de l'étendue de la maladie aux régions corticales, tel qu'une agressivité, des troubles du langage (aphasie), de l'humeur, des fonctions exécutives, de l'identification (agnosie) ou encore de l'exécution des mouvements (apraxie). Toute forme de mémoire est également affectée. L'aggravation de ces symptômes entraîne une perte de la coordination motrice, à l'origine d'un risque élevé de chutes, puis d'une perte complète de la locomotion et donc de l'autonomie du patient. La phase terminale de la maladie se traduit par un alitement permanent, un état de fatigue intense et une absence quasi totale de communication verbale. Après une évolution médiane comprise entre 7 et 10 ans (Brookmeyer et al., 2002), le patient décède souvent en raison d'un facteur externe à la maladie comme une pneumonie.

## 3. Diagnostic

Actuellement, aucun traitement curatif de la MA n'existe. Il est toutefois indispensable de la diagnostiquer rapidement afin de mettre en place un plan d'aide adapté aux patients qui en sont atteints. Le diagnostic clinique de probabilité de la MA repose sur différents critères d'appartenance définis par la « National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (McKhann et al., 1984) (Figure 2). Afin de mettre en évidence les altérations cognitives du patient, le clinicien dispose de différents tests neuropsychologiques standardisés, notamment le MMSE (Mini Mental State Evaluation), qui est recommandé par la Haute Autorité de santé. Ce test de 18 questions/tâches est réalisable en 15 minutes et fournit un score compris entre 0 et 30. Un score inférieur à 24 est suspect de démence. Le niveau éducatif du patient doit toutefois être pris en compte car susceptible d'influencer à la hausse les résultats du test. Le diagnostic de probabilité de la MA est renforcé par l'évolution du patient au fil des consultations ainsi que par l'imagerie cérébrale. En effet l'IRM peut révéler une atrophie hippocampique, de la même manière la TEP (tomographie à émission de positons) peut mettre en évidence une réduction de l'activité métabolique de l'hippocampe.

Enfin le dosage de la protéine tau totale, tau phosphorylée et du peptide amyloïde 1-42 dans le LCR peut également être effectué par une ponction lombaire. Le diagnostic formel de la MA reste néanmoins uniquement possible à la mort du patient par l'observation conjointe des deux lésions cérébrales que sont la DNF et la présence de plaques séniles.

1. Critères de maladie d'Alzheimer probable :
  - syndrome démentiel établi sur des bases cliniques et documenté par le *Mini-Mental State Examination*, le *Blessed Dementia Scale* ou tout autre test équivalent et confirmé par des preuves neuropsychologiques
  - déficit d'au moins deux fonctions cognitives
  - altérations progressives de la mémoire et des autres fonctions cognitives
  - absence de trouble de conscience
  - survenue entre 40 et 90 ans, le plus souvent au-delà de 65 ans
  - en l'absence de désordres systémiques ou d'une autre maladie cérébrale pouvant rendre compte par eux-mêmes, des déficits mnésiques et cognitifs progressifs
2. Ce diagnostic de maladie d'Alzheimer probable est renforcé par :
  - la détérioration progressive des fonctions telles que le langage (aphasie), les habiletés motrices (apraxie) et perceptives (agnosie)
  - la perturbation des activités de la vie quotidienne et la présence de troubles du comportement
  - une histoire familiale de troubles similaires surtout si confirmés histologiquement
  - le résultat aux examens standards suivants :
    - normalité du liquide céphalo-rachidien
    - EEG normal ou siège de perturbations non spécifiques comme la présence d'ondes lentes
    - présence d'atrophie cérébrale d'aggravation progressive
3. Autres caractéristiques cliniques compatibles avec le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable après exclusion d'autres causes :
  - période de plateaux au cours de l'évolution
  - présence de symptômes tels que dépression, insomnie, incontinence, idées délirantes, illusions, hallucinations, réactions de catastrophe, désordres sexuels et perte de poids. Des anomalies neurologiques sont possibles surtout aux stades évolués de la maladie, notamment des signes moteurs tels qu'une hypertonie, des myoclonies ou des troubles de la marche.
  - crises comitiales aux stades tardifs
  - scanner cérébral normal pour l'âge
4. Signes rendant le diagnostic de maladie d'Alzheimer probable incertain ou improbable :
  - début brutal
  - déficit neurologique focal tel que hémiparésie, hypoesthésie, déficit du champ visuel, incoordination motrice à un stade précoce
  - crises convulsives ou troubles de la marche en tout début de maladie
5. Le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer possible :
  - peut être porté sur la base du syndrome démentiel, en l'absence d'autre désordre neurologique, psychiatrique ou systémique susceptible de causer une démence, en présence de variante dans la survenue, la présentation ou le cours de la maladie ;
  - peut être porté en présence d'une seconde maladie systémique ou cérébrale susceptible de produire un syndrome démentiel mais qui n'est pas considérée comme la cause de cette démence ;
  - et pourrait être utilisé en recherche clinique quand un déficit cognitif sévère progressif est identifié en l'absence d'autre cause identifiable.
6. Les critères pour le diagnostic de maladie d'Alzheimer certaine sont :
  - les critères cliniques de la maladie d'Alzheimer probable ;
  - et la preuve histologique apportée par la biopsie ou l'autopsie.

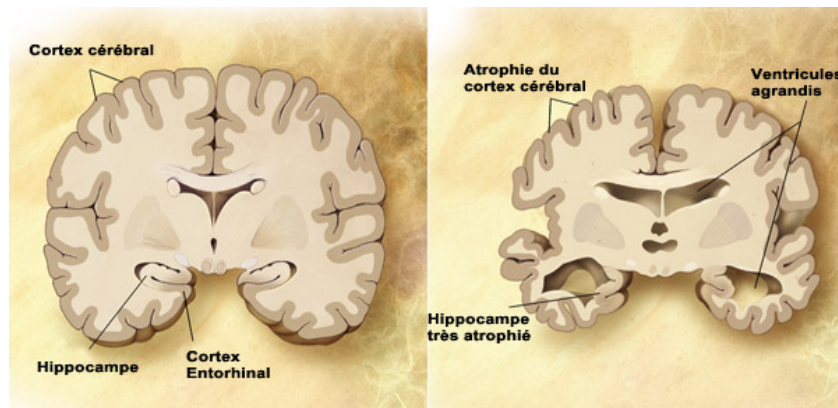
**Figure 2** Critères diagnostiques de la MA selon la NINCDS-ADRDA, 1984.

## 4. Lésions neuropathologiques

### 4.1. Atrophie cérébrale

L'imagerie cérébrale permet de mesurer chez le patient l'extension de la perte neuronale par observation des structures cérébrales atrophiées. Cette atrophie progresse de manière

stéréotypée au cours du développement de la maladie et est à l'origine des symptômes cliniques. Elle concerne de manière précoce le lobe temporal médian (hippocampe, amygdale, cortex entorhinal). Une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux est également observée (Figure 3). La présence conjointe de deux lésions que sont les plaques séniles et la DNF, est à l'origine d'une perte progressive de l'intégrité synaptique et de la neurodégénérescence et de l'atrophie cérébrale qui en résulte.



**Figure 3** Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau sain (gauche) et atrophié à un stade avancé de la MA (droite).

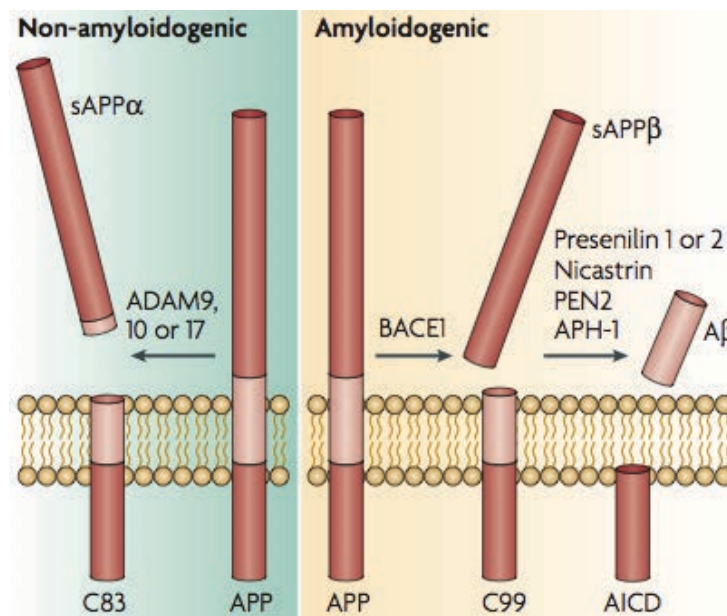
#### 4.2. Dépôts amyloïdes extracellulaires

La formation des dépôts amyloïdes débute dans les régions néocorticales (cortex frontal, pariétal, temporal, occipital), puis s'étend vers le cortex entorhinal, l'hippocampe et l'amygdale avant de gagner les régions subcorticales (ganglions de la base, thalamus, hypothalamus), le tronc cérébral et le cervelet (Figure 4). La progression de ces dépôts se développe de façon antérograde en suivant les voies neuro-anatomiques (Thal et al., 2002).



**Figure 4** Les cinq phases du développement de la pathologie amyloïde. Phase 1 : atteinte néocorticale ; Phase 2 : atteinte allocorticale (Hippocampe, cortex entorhinal, amygdale) ; Phase 3 : les dépôts amyloïdes gagnent le diencephale et le striatum ; Phase 4 : le tronc cérébral commence à être affecté ; Phase 5 : progression de la pathologie dans le tronc cérébral en parallèle d'une atteinte cérébelleuse (Thal et al., 2002).

La purification des constituants des plaques séniles extracellulaires par chromatographie a permis de mettre en évidence la présence d'un peptide amyloïde A $\beta$  de 4kDa organisé sous la forme de feuillets  $\beta$ -plissés (Glennner et Wong, 1984). Ce peptide A $\beta$  est issu du clivage séquentiel de l'APP (amyloid precursor protein), une protéine transmembranaire, par la  $\beta$ -secrétase BACE-1 et le complexe  $\gamma$ -secrétase comprenant notamment les présénilines 1 et 2 (Figure 5). Cette voie amyloïdogénique mène majoritairement à la formation d'un peptide A $\beta$  de 40 (A $\beta_{1-40}$ ) ou 42 acides aminés (A $\beta_{1-42}$ ) selon un ratio A $\beta_{1-40}$ /A $\beta_{1-42}$  égal à 10. De nature plus hydrophobe, l'isoforme A $\beta_{1-42}$  présente des capacités agrégatives plus élevées et constitue majoritairement les dépôts amyloïdes extracellulaires (Jarrett et al., 1993 ; Younkin et al., 1998), alors que l'isoforme A $\beta_{1-40}$  se retrouve plutôt dans le compartiment vasculaire. Le précurseur APP peut également subir un clivage protéolytique à l'intérieur de la séquence codant pour le peptide amyloïde et empêchant de fait sa formation. Ce clivage s'effectue par des enzymes appartenant à la famille des  $\alpha$ -secrétases et génère un fragment soluble sAPP $\alpha$  aux propriétés neuroprotectrices (Zhou et al., 2011)

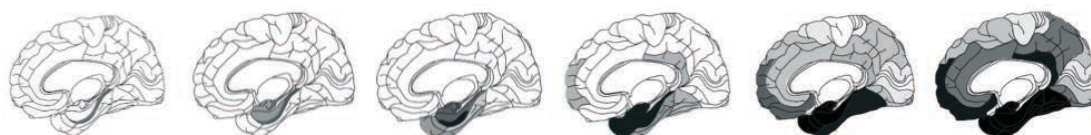


**Figure 5** Protéolyse d'APP. Le clivage d'APP en position 99 à partir de l'extrémité C-terminale par BACE-1 forme le composé C99, lui-même clivé par le complexe  $\gamma$ -secrétase pour donner naissance au peptide amyloïde (voie amyloïdogénique). Le peptide A $\beta$  libéré va alors s'oligomériser et former progressivement les dépôts extracellulaires. Durant la voie non amyloïdogénique, la protéine APP est clivée par l' $\alpha$ -secrétase en position 83, libérant alors l'extrémité N-terminale (sAPP $\alpha$ ). Le fragment CTF83 peut quant à lui être clivé par la  $\gamma$ -secrétase et donner naissance à l'AICD et le fragment P3 (non montré) (Laferla et al., 2007).

### 4.3. La dégénérescence neurofibrillaire

La seconde lésion histopathologique retrouvée dans le cerveau des patients est la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). L'observation par microscopie électronique de cette lésion a révélé une structure en filaments de 10nm de diamètre appariés en hélice ou PHF (paired helical filament). L'analyse biochimique a ensuite mis en évidence qu'ils étaient composés de l'accumulation intra-neuronale de protéine tau (tubulin associated unit) hyper- et anormalement phosphorylées (Brion et al., 1985).

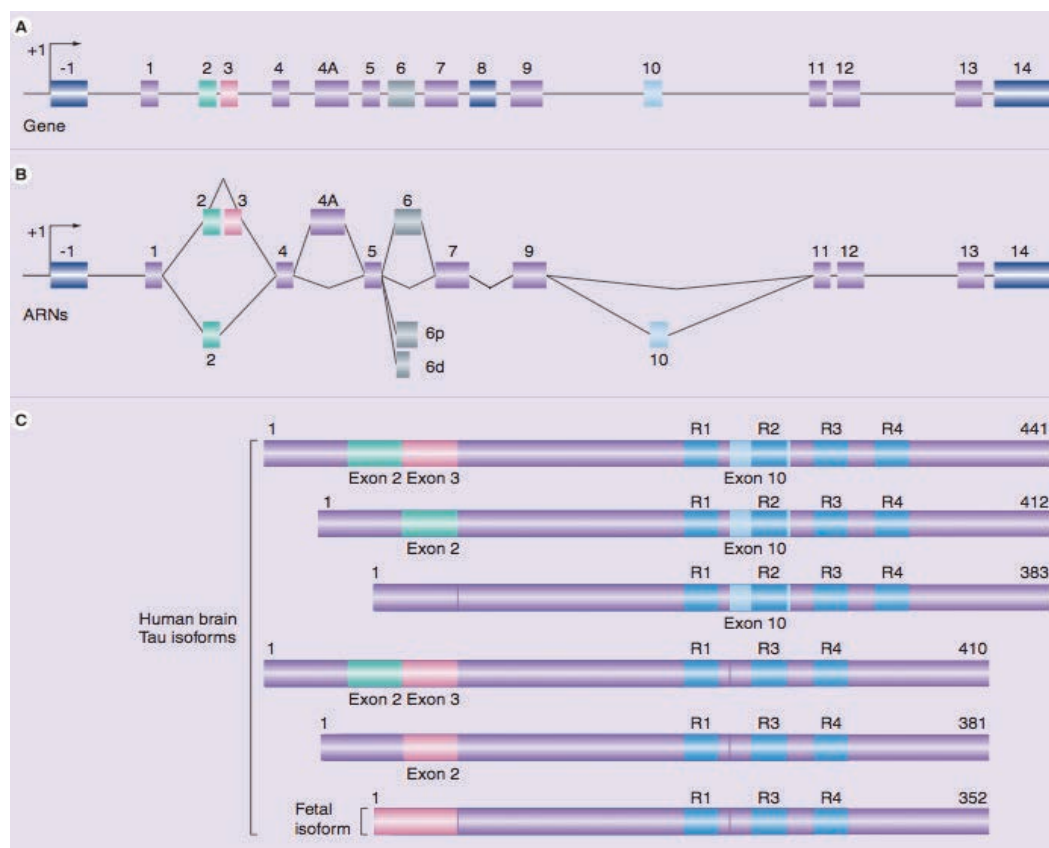
Cette lésion n'est pas intrinsèque à la MA mais est commune à plus de 20 pathologies neurodégénératives regroupées sous le nom de tauopathie parmi lesquelles la démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17), le syndrome de Drown, la sclérose latérale amyotrophique, la dégénérescence corticobasale, et la paralysie supranucléaire progressive (Buée et al., 2000). L'observation post-mortem de 83 cerveaux a permis à Braak et collaborateurs de mettre en évidence un développement spatio-temporel stéréotypé de cette lésion et d'identifier six stades de progression (Braak et Braak, 1991). Elle affecte initialement le cortex entorhinal puis l'hippocampe, gagne ensuite la région temporale, le néocortex associatif et atteint finalement les régions primaires (Figure 6). De manière intéressante, une corrélation entre la progression de la DNF et les altérations cognitives a été observée (Duyckaerts et al., 1997). Enfin, les équipes de Lewis et Götz ont tout deux démontré une augmentation de la DNF en présence du peptide amyloïde (Götz et al., 2001 ; Lewis et al., 2001). L'apparition du peptide A $\beta$  pourrait alors potentialiser la pathologie tau hippocampique préexistante au cours du vieillissement normal et favoriser le développement de la MA.



**Figure 6** Distribution de la pathologie Tau au cours de la MA. La DNF apparaît initialement dans la formation hippocampique puis progresse de façon stéréotypée vers les régions corticales (Delacourte et al., 1999).

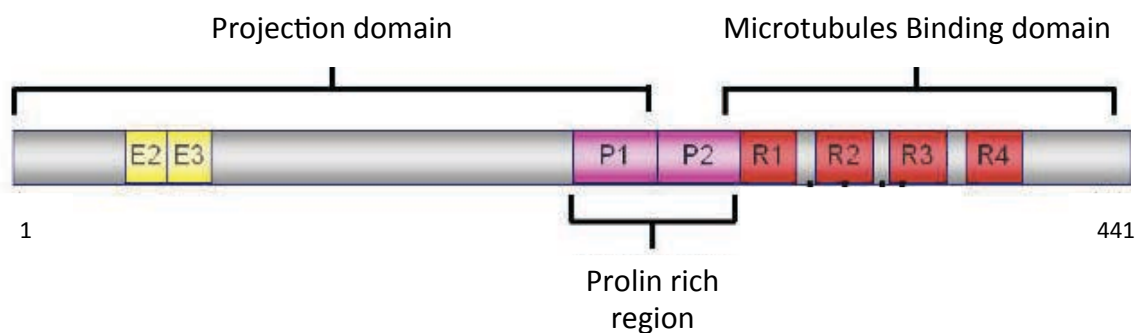
### 4.3.1. Structure du gène et de la protéine tau

Le gène humain *mapt* codant pour la protéine tau est localisé sur le chromosome 17 en position 17q21 et s'étend sur plus de 130kb. Il est principalement exprimé dans le système nerveux central et périphérique mais son expression est également retrouvée dans le cœur, le muscle squelettique, le poumon, le rein et dans une moindre mesure dans le foie et l'estomac (Gu et al., 1996). La maturation du transcrit primaire, qui contient 16 exons, consiste en un épissage alternatif de certains d'entre eux générant de fait plusieurs isoformes possibles de la protéine. C'est le cas des exons 2, 3 et 10. L'exon 3 ne pouvant être présent sans l'exon 2, l'épissage alternatif de ces trois exons conduit à la formation de 6 isoformes dans le cerveau adulte, une seule est présente chez le fœtus (Figure 7). Les exons 4a et 8 sont quant à eux systématiquement épissés dans le cerveau humain et sont présents uniquement dans les tissus périphériques alors que l'exon 6 est retrouvé de manière minoritaire (Luo et al., 2004).



**Figure 7** Gène *mapt* et son transcrit primaire. Le gène humain *mapt* codant pour la protéine tau comporte 16 exons (A). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs à l'inverse des exons 4a et 6. Les exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif (B) et sont à l'origine des isoformes 3R et 4R retrouvées dans le cerveau humain (C) (Sergeant et al., 2008)

Dans le cerveau humain, les 6 isoformes de la protéine tau comptent entre 352 et 441 acides aminés pour un poids moléculaire apparent compris entre 45 et 65kDa en électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE. En fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10 dans le transcrit mature, la protéine tau possède respectivement 4 (4R) ou 3 (3R) domaines de liaisons aux microtubules localisés dans sa partie carboxy-terminale, ce qui modifiera alors sa liaison aux microtubules et son efficacité à promouvoir leur polymérisation (Goedert et Jakes, 1990 ; Butner et Kirschner, 1991). La partie amino-terminale de la protéine constitue son domaine de projection, qui est une région acide comprenant notamment les deux séquences de 29 acides aminés codés par les exons 2 et 3 (Figure 8). Cette région peut lier d'autres éléments du cytosquelette et définit l'espace entre les microtubules axonaux, ce qui détermine alors le diamètre de l'axone (Chen et al., 1992). Le domaine de projection compte également une région riche en proline qui est elle fortement basique, ce qui fait de la protéine tau une protéine dipolaire.



**Figure 8** Représentation schématique de l'isoforme 2+3+10+ comprenant 441 acides aminés. Le domaine de projection amino-terminale qui comprend la région riche en proline, détermine l'espace entre les microtubules en se fixant à des protéines du cytosquelette mais est également impliqué dans des voies de transduction. La région carboxy-terminale, de par ses domaines de fixation aux microtubules, assure quant à elle leur polymérisation et leur stabilité.

#### 4.3.2. Modifications post-traductionnelles

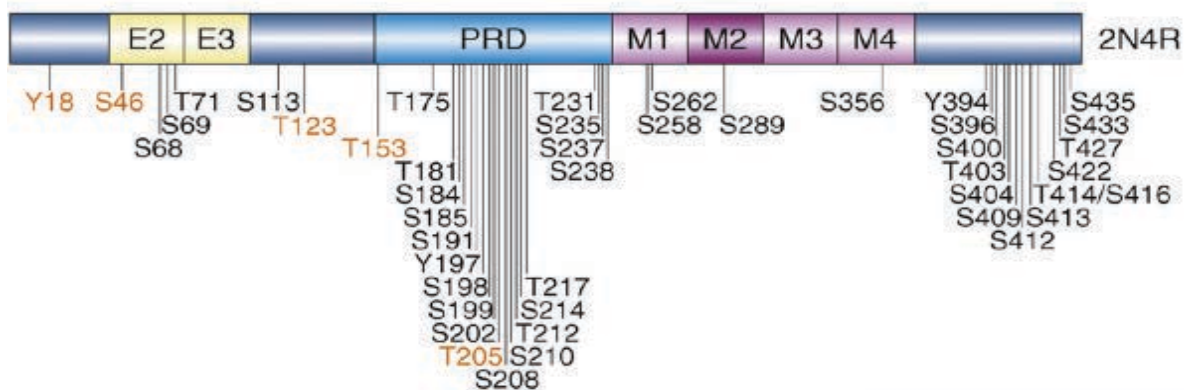
Les mécanismes moléculaires responsables de la désolidarisation de la protéine tau des microtubules et de sa nucléation vers la formation de DNF ne sont pas totalement élucidés. Comprendre ses modes de régulation à travers l'étude fonctionnelle de ses modifications post-traductionnelles s'avère donc indispensable. La phosphorylation, la glycosylation et la troncation font partie de la dizaine de modifications post-traductionnelles que peut subir la



protéine tau (pour revue : Martin et al., 2011). Chacune de ces voies est finement régulée et une perturbation dans cet équilibre peut participer à la formation d'espèces toxiques de tau comme retrouvées dans les tauopathies.

#### 4.3.2.1. Phosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle de tau la plus commune et également la plus étudiée, facilitée par la disponibilité de nombreux outils immunologiques spécifiquement dirigés contre des épitopes phosphorylés, la spectrométrie de masse ou encore les techniques de RMN. Elle consiste en l'ajout d'un résidu phosphate sur les acides aminés sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y). La protéine tau possède 85 sites potentiels de phosphorylation dont la majorité se retrouve plutôt dans sa partie carboxy-terminale (Figure 9). Son niveau de phosphorylation est sous la dépendance d'un équilibre entre kinases et phosphatases. Une perturbation de cet équilibre semble être à l'origine de l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de tau retrouvée dans la MA, ce qui réduit alors son affinité pour les microtubules ainsi que sa solubilité (voir partie 4.3.4.1 de ce chapitre).



**Figure 9** Position des sites de phosphorylation de tau retrouvé dans le cerveau de patients atteints de la MA. Environ 45 sites ont été identifiés dont cinq grâce à l'utilisation d'anticorps phospho-épitopes spécifiques (orange). Ces sites se retrouvent essentiellement dans la région riche en proline (PRD : Prolin Rich Domain) et à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. (Hanger et al., 2009).

##### 4.3.2.1.1. Kinases

Il existe une trentaine de kinases impliquée dans la phosphorylation de tau réparties en trois catégories sur la base de leur nature et de leur site consensus : PDPK (prolin-directed protein

kinases), non-PDPK et TPK (Tyrosine protein kinases). Chaque kinase reconnaît spécifiquement certains épitopes de la protéine et peut donc être impliqué lors d'une altération du niveau de phosphorylation de l'épitope qu'elle contrôle (Sergeant et al., 2008). Les PDPK sont des kinases ciblant des sérines et thréonines précédant un résidu proline (motif S/TP). La glycogen synthase kinase-3 (GSK3), cyclin-dependent protein kinase-5 (CDK5) et la famille des mitogen-activated protein kinases (MAPK) tel que p38, extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK1/2) et c-Jun N-terminal kinases (JNK) appartiennent à cette catégorie. Les non-PDPK regroupent les tau-tubulin kinases 1/2 (TTBK1/2), les caséines kinases 1 $\alpha$ , 1 $\delta$ , 1 $\epsilon$ , 2 (CK1 $\alpha$ , CK1 $\delta$ , CK1 $\epsilon$  /2), les microtubule affinity-regulating kinases (MARK), la PKA, Akt, PKC, PKN et la calmodulin-dependent protein kinases II (CaMKII). La dernière catégorie regroupe notamment les tyrosines kinases Src et Fyn. Toutes ces kinases présentent une contribution relative à la phosphorylation « pathologique » de la protéine tau retrouvée dans la MA (pour revue : Martin et al., 2013a), si bien que l'inhibition de certaines constitue une piste thérapeutique potentielle.

#### 4.3.2.1.2. Phosphatases

Les phosphatases se répartissent en trois catégories déterminées à partir de la structure de leur site catalytique et de leur sensibilité aux inhibiteurs : les phosphoprotéines phosphatase (PPP), les protéines tyrosine phosphatase (PTP) et les protéines phosphatases dépendantes d'un ion métallique. Dans le cerveau humain non pathologique, l'activité phosphatase est majoritairement attribuée à l'activité de PP2A (71%) alors que PP1, PP5 et PP2B comptent respectivement pour 11, 10 et 7% de l'activité totale (Liu et al., 2005). Les phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de la protéine tau sont au nombre de cinq : PP1, PP2A, PP2B et PP5 (PPP), ainsi que PTEN (PTP) (pour revue : Martin et al., 2013b). L'équipe de Liu et collaborateur a démontré une réduction respective de 50 et 20% de l'activité de PP2A et PP5 dans le cerveau de patient atteint de la MA. De plus, le niveau de corrélation entre la baisse d'activité de PP2A et l'augmentation de la phosphorylation de tau est significatif sur la majorité des 11 épitopes étudiés (Liu et al., 2005), faisant de la PP2A la phosphatase majeure de la protéine tau (Torrent et Ferrer, 2012).

#### 4.3.2.2. Autres modifications post-traductionnelles

La glycosylation est la seconde modification post-traductionnelle subie par tau après la phosphorylation. Elle consiste en l'ajout d'un oligosaccharide sur un résidu asparagine (N-glycosylation), sérine ou thréonine (O-glycosylation). Les études post-mortem et in vivo ont

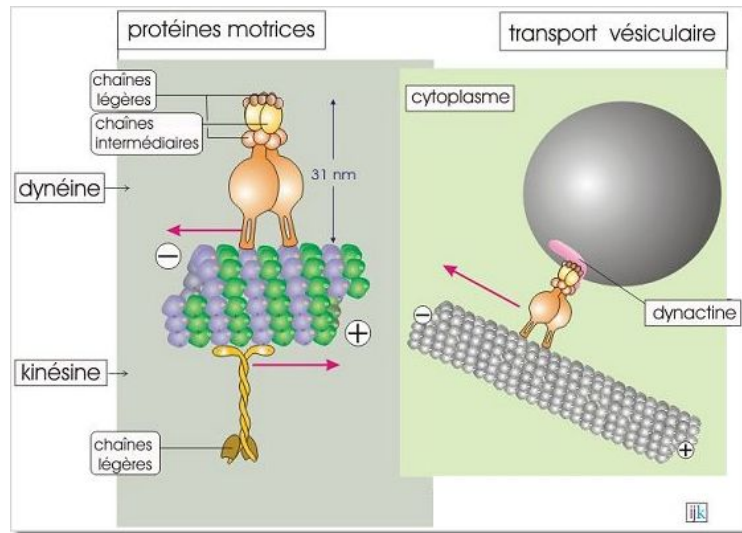
révélé une corrélation inverse entre la O-glycosylation et la phosphorylation de la protéine tau (Robertson et al., 2004), suggérant une compétition entre ces deux modifications post-traductionnelles. Les études in vitro vont dans cette direction, et mettent en évidence une réduction de l'hyperphosphorylation et l'agrégation de tau par la O-glycosylation (Liu et al., 2004 ; Yu et al., 2008 ; Smet-Nocca et al., 2011). La troncation de tau aux sites D13, E391 et D421 est une autre modification post-traductionnelle de tau. Ces formes tronquées sont retrouvées dans le cerveau de patients atteints de MA et sont corrélés à la progression de la pathologie (Horowitz et al., 2004 ; Basurto-Islas et al., 2008). Il a par ailleurs été observé que le clivage de tau en ces sites ferait suite à l'hyperphosphorylation de la protéine et participerait à son agrégation (Mondragón-Rodríguez et al., 2008). Enfin glycation, acétylation, prolyl-isomérisation, nitration, polyamination, ubiquitination, sumoylation et oxydation sont d'autres modifications potentielles pouvant être subie par la protéine tau et susceptibles d'influer sur la progression de la MA (Martin et al., 2011).

#### 4.3.3. Fonction physiologique de la protéine

##### 4.3.3.1. Une protéine d'association aux microtubules

Tau est une protéine d'association aux microtubules (MAP pour microtubule associated protein) dont la fonction première consiste à promouvoir leur assemblage et leur stabilité (Weingarten et al., 1975 ; Connolly et al., 1977). A l'instar des microfilaments d'actine et des filaments intermédiaire, les microtubules font partie du cytosquelette qui constitue en quelque sorte la charpente de la cellule. Ce sont des structures dynamiques et polarisées qui présentent une extrémité + et une extrémité - correspondant respectivement au lieu de polymérisation et dépolymérisation. Les microtubules sont formés à partir de l'association d'hétérodimères de tubuline ( $\alpha$  et  $\beta$ ) en proto-filaments. Ces derniers s'assemblent littéralement entre eux pour former des feuilletts qui se replient progressivement sur eux même afin de définir un cylindre creux de 25nm de diamètre qu'est le microtubule. Leur dépolymérisation spontanée en fait des structures particulièrement labiles et instables. En s'associant aux microtubules par l'intermédiaire de ses 3 ou 4 domaines de liaison, la protéine tau promeut leur polymérisation et stabilise le réseau microtubulaire (Drechsel et al., 1992). Elle contribue alors au maintien de la morphologie neuronale et la formation des axones et dendrites de même qu'au transport axonal. En effet, les microtubules interagissent avec les protéines « motrices » kinésine et dynéine. Ces protéines sont responsables de la mobilité des vésicules ou organelles à travers la cellule le long des rails formés par les microtubules, ce qui est particulièrement important dans la cellule nerveuse compte tenu de l'éloignement existant entre la synthèse somatique et

la sécrétion axonale des neurotransmetteurs. La kinésine assure uniquement un transport vers l'extrémité + du microtubule, on parle alors de transport antérograde (du soma vers le bouton axonal). A l'inverse, le complexe dynéine-dynactine assure un transport vers l'extrémité – et donc rétrograde (du bouton axonal vers le soma) (Figure 10).



**Figure 10** Représentation du transport axonal médié par la kinésine et le complexe dynéine/dynactine ([www.ulyse.u-bordeau.fr](http://www.ulyse.u-bordeau.fr)).

En stabilisant le réseau microtubulaire, la protéine tau assure un transport axonal compatible avec le bon fonctionnement cellulaire. Par ailleurs, elle peut directement participer à ce transport en modulant l'activité des kinésines et dynéines (Dixit et al., 2008 ; Dubey et al., 2008). Enfin, par l'intermédiaire de son domaine de projection, elle peut contrôler l'espace entre deux neurofilaments et influencer sur le diamètre de l'axone (Chen et al., 1992 ; Wegmann et al., 2013).

#### 4.3.3.2. Implication de la protéine tau dans la signalisation cellulaire

La protéine tau peut interagir avec d'autres éléments du cytosquelette que les microtubules tels que les microfilaments d'actine ou les filaments intermédiaires, via son domaine de projection (Miyata et al., 1986 ; Henriquez et al., 1995), faisant une interconnexion entre les trois composants du cytosquelette et la membrane plasmique à laquelle elle peut se fixer (Brandt et al., 1995). Par l'intermédiaire de son domaine riche en proline, la protéine tau peut également interagir avec les domaines SH3 de la PLC $\gamma$ , de la sous unité p85 de la PI3K, de Grb2 ainsi que des tyrosines kinases Src, Fyn et Lck (Jenkins et Johnson, 1998 ; Lee et al., 1998 ; Reynolds et al., 2008 ; Scales et al., 2011). Elle peut également lier le complexe GSK-3 $\beta$ -protéines 14-3-3 (Agarwal-Mawal et al., 2003 ; Yuan et al., 2004). Ces résultats

démontrent qu'en plus de son rôle de protéine d'assemblage du cytosquelette, tau est impliquée dans la signalisation cellulaire.

#### 4.3.3.3. Une protéine nucléaire

Une localisation nucléaire de la protéine tau neuronale a été observée (Loomis et al., 1990 ; Wang et al., 1993). Outre une fonction dans le réarrangement nucléolaire (Sjöberg et al., 2006), cette translocation du compartiment cytosolique au compartiment nucléaire fait suite à un stress cellulaire (stress oxydant). Dans ce contexte, la protéine tau, qui présente alors un faible niveau de phosphorylation, se lie à l'ADN et lui assure un rôle de protection. En effet, en absence de tau, les lésions à l'ADN induites par un stress cellulaire et pouvant être modélisées par un stress hyperthermique sont considérablement augmentées (Sultan et al., 2011). En se liant à l'ADN, la protéine tau participe donc au maintien de l'intégrité génomique.

#### 4.3.4. Dérégulation des fonctions physiologiques de tau et formation de la DNF

La concentration cytosolique de la protéine tau est de l'ordre du  $\mu\text{M}$  alors que sa solubilité maximale est atteinte pour des concentrations 1000 fois plus élevées, ce qui explique le caractère fortement soluble de tau dans des conditions physiologiques. Sa nucléation progressive vers des espèces de solubilité intermédiaires (oligomériques) puis insolubles (PHF) est la conséquence de mécanismes pathologiques ayant pris place dans le cerveau de patient atteint de la MA tel que l'hyperphosphorylation et la troncation.

##### 4.3.4.1. Tau : une protéine hyper- et anormalement phosphorylée

Les études post-mortem réalisées sur les cerveaux de patients atteints de la MA mettent en évidence un niveau de phosphorylation de la protéine tau 3 à 4 fois plus élevé que chez les sujets sains. Cela traduit une augmentation du niveau global de phosphorylation de la protéine tau et/ou une élévation de la quantité de protéines tau phosphorylées en un épitope particulier (Iqbal et al., 1986 ; Köpke et al., 1993 ; Ksiezak-Reding et al., 1992). Cet excès de phosphorylation résulte d'un déséquilibre entre l'activité des kinases et phosphatases de tau. La réduction de l'activité des phosphatases et notamment de PP2A observée dans la MA, contribue en effet à maintenir un niveau élevé de phosphorylation de la protéine tau (Liu et al., 2005), potentialisé par une levée d'inhibition de la phosphatase sur les kinases CAMKII (Baner et al., 1991), Erk1/2 (Zhao et al., 2003), CDK5 (Tanaka et al., 1998) ou encore PKA (Li et al., 1998). L'hyperphosphorylation de tau au cours de la MA a par ailleurs été observée

comme étant un processus séquentiel où la phosphorylation de certains épitopes nécessite au préalable des changements conformationnels permis par la phosphorylation d'autres épitopes. L'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre des épitopes phosphorylés a permis l'étude de ces processus. La phosphorylation de Tau par la GSK-3 $\beta$  en Thr231, Ser396 et Ser400 nécessite ainsi une pré-phosphorylation en Ser235, et Ser404 rendant de sorte plus accessible la protéine tau (Li et Paudel, 2006). De la même manière la formation de l'épitope conformationnel AT100, nécessite au préalable une phosphorylation respective des épitopes Thr212 et Ser214 par la GSK-3 $\beta$  et la PKA (Zheng-Fischhöfer et al., 1998). Ces mécanismes conduisent alors dans le cerveau de patients atteints de la MA à une hyperphosphorylation de la protéine tau sur des épitopes potentiellement phosphorylés en condition non pathologique, mais également une phosphorylation anormale, telle que révélée par les anticorps AT-100 ou AP422, totalement absente chez le sujet sain.

#### 4.3.4.2. Perte de fonction physiologique

L'augmentation des espèces phosphorylées de tau va avoir pour conséquence de réduire l'affinité de tau aux microtubules (Schneider et al., 1999), ce qui déstabilise alors le réseau microtubulaire (Alonso et al., 1996 ; Alonso, 1997 ; Li et al., 2007) et altère le transport axonal antérograde et l'intégrité synaptique (Mandelkow et al., 2003 ; Cowan et al., 2010). Il a par ailleurs été observé que l'hyperphosphorylation de tau réduit la protection de l'ADN et l'intégrité génomique (Lu et al., 2013). De plus, les interactions entre la protéine tau et les domaines SH3 de ses partenaires peuvent être modifiées (Ekinci et Shea, 2000 ; Reynold et al., 2008 ; Usardi et al., 2011) et avec elles les voies de transductions en aval. Ces pertes de fonction physiologiques peuvent être à l'origine d'un gain de fonction toxique favorisant la progression de la MA. En effet, les protéine tau hyperphosphorylées sont délocalisées du compartiment axonal vers le compartiment somato-dendritique (Tashiro et al., 1997). Cette relocalisation participe, notamment via Fyn, au phénomène d'excitotoxicité NMDA-dépendante induit par A $\beta$  et donc à la neurodégénérescence (Ittner et al., 2010, Roberson et al., 2011 ; Boehm, 2013).

#### 4.3.4.3. Formation des agrégats de tau et gain de fonction toxique

L'élévation des niveaux de phosphorylation va induire des changements conformationnels de la protéine tau à l'origine de sa nucléation vers des formes agrégées. L'analyse des structures PHF a en effet principalement identifiée des espèces phosphorylées de la protéine tau (Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Iqbal et al., 1986). En outre, la déphosphorylation de tau par

PP2A induit une dissociation de ces PHF (Wang et al., 1995 ; Wang et al., 1996), suggérant alors la phosphorylation comme prérequis à l'agrégation (Mondragón-Rodriguez et al., 2013). Les formes hyperphosphorylées de tau, détachées des microtubules, semblent de plus induire le recrutement de protéines tau normales pour former des agrégats (Alonso et al., 1996).

Il existe également dans le contexte de la MA un déséquilibre entre la formation des fragments protéolytiques de tau par les caspases/calpaïnes et leur clairance, conduisant alors à l'accumulation de formes tronquées (pour revue : Chesser et al., 2013). Ces espèces ont une tendance à s'oligomériser entre eux, et participent alors à la formation des formes agrégées de tau (de Calignon et al., 2010). En outre des fragments solubles toxiques sont générés et contribuent à la dégénérescence neuronale (Reinecke et al., 2011), ainsi qu'à la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire (Zilka et al., 2009).

La corrélation existante entre la DNF et la sévérité des déficits cognitifs a longtemps suggéré un rôle pro-toxique des formes agrégées de tau (pour revue Gendron et Petrucelli, 2009), or il semble aujourd'hui que ces espèces constituent plutôt un réservoir de protéines tau à la toxicité modérée (Morsch et al., 1999 ; Andorfer et al., 2005 ; Spires et al., 2006), et que les espèces oligomériques de tau, plus solubles, soient à l'origine des effets toxiques de tau dans la MA (SantaCruz et al., 2005 ; Le Corre et al., 2006, Ward et al., 2012), ce qui contribue à la perte progressive de l'intégrité synaptique et de la dégénérescence neuronale.

#### 4.3.4.4. Propagation de la DNF

La formation de la DNF s'effectue de manière progressive et stéréotypée au cours de la MA, ce qui suggère l'existence de transfert inter-neuronal d'agrégats de protéines tau permettant la propagation de la lésion au sein du cerveau. En effet, l'injection intra-hippocampique d'oligomères de tau isolés à partir de cerveaux de patients atteints de la MA chez des souris wt, induit 11 mois plus tard la présence d'agrégats de tau dans la région injectée mais également dans les régions voisines (hypothalamus, cortex), mettant ainsi en évidence une propagation de la pathologie tau (Lasagna-Reeves et al., 2012). Cette propagation semble suivre des voies neuro-anatomiques puisque l'injection de fibrilles synthétiques de tau dans l'hippocampe conduit à l'apparition d'agrégats dans le cortex entorhinal. De même des agrégats de tau sont formés dans la substance noire, le corps calleux et le thalamus à la suite d'une injection striatale (Iba et al., 2013). Enfin, le modèle murin P301L exprimant uniquement la protéine tau humaine mutée dans le cortex entorhinal, forme initialement des agrégats dans cette région puis dans le gyrus denté, l'hippocampe et le cortex cingulaire (de

Calignon et al., 2012). Ces résultats semblent donc mettre en évidence une transmission des espèces agrégées de tau selon un mécanisme « cell-to-cell » (Clavaguera et al., 2013), en suivant des voies neuro-anatomiques à l'origine de la propagation de la DNF au cours de la MA.

Les modalités de propagation des oligomères de tau ne sont actuellement pas formellement établies. Des structures en forme de nanotubes comme observées pour le prion (Gousset et al., 2009), pourraient permettre le transfert direct de ces oligomères d'une cellule à l'autre sans passer par le milieu extracellulaire. A l'inverse, ils pourraient être secrétés via un mécanisme d'exocytose, comme observé in vitro dans un modèle de neuroblastome humain au travers de la formation d'exosomes contenant des espèces phosphorylées de tau (Saman et al., 2012). Ce dernier mécanisme, ainsi que le relargage d'oligomères due à la mort neuronale, explique par ailleurs la présence d'espèces agrégées de tau phosphorylés dans le milieu extracellulaire (Saman et al., 2012 ; Simón et al., 2012), contribuant alors aux effets neurotoxiques de tau et à la mise en place d'une réaction neuro-inflammatoire.



## Chapitre 2 : Présentation générale du système immunitaire cérébral et des processus neuro-inflammatoires

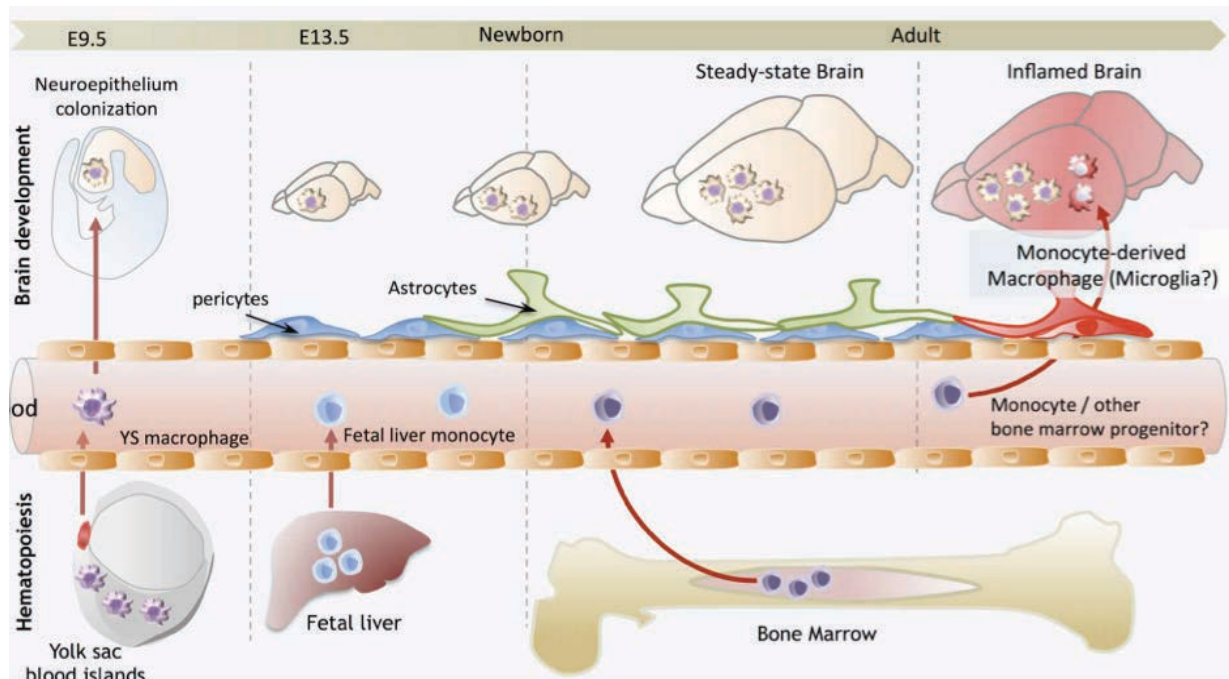
L'inflammation est une réaction de défense locale mise en place par le système immunitaire (SI) à la suite d'une agression portant atteinte à l'intégrité de l'organisme dans l'objectif de neutraliser voire réverser les effets délétères produits. Il s'agit d'un mécanisme complexe au cours duquel les cellules immunitaires impliquées (macrophages, neutrophiles, lymphocytes) communiquent et coordonnent leur action par la libération de différents signaux (cytokines, chémokines, complément). Elle peut être déclenchée par l'intrusion d'agents infectieux (bactérie / virus), de lésions (traumatisme physique, brûlure, irritation chimique) ou encore par des dysfonctionnement du SI (maladie auto-immune, allergies). L'inflammation se termine alors lorsque le facteur initiateur de cette réponse infectieuse a été complètement éliminé. Dans le cas de maladies auto-immunes ou neuro-dégénératives, l'inflammation persiste pour devenir chronique et inappropriée, ce qui peut induire des lésions dans les tissus sains. Dans le cas des maladies neuro-dégénératives, dont la MA fait partie, l'inflammation peut être déclenchée par la présence d'agrégats protéiques extracellulaires, l'accumulation anormale de constituants cellulaires modifiés ou encore la libération de molécules immunogéniques par les neurones en souffrance (Wyss-Coray et Mucke, 2002). La mise en place d'une réponse inflammatoire dans le cerveau fait principalement intervenir les cellules microgliales, qui sont les cellules phagocytaires résidentes du cerveau, même si neurones et astrocytes sont également impliqués et modulent cette réponse. Les lymphocytes et monocytes circulants issus de la périphérie peuvent par ailleurs infiltrer le cerveau par chimiotactisme dans certaines situations neuropathologiques et contribuer alors à la réponse neuro-inflammatoire (Rezai-Zadeh et al., 2009). Cette réponse va alors moduler la physiopathologie, mais compte tenu des actions pléiotropes des facteurs impliqués, il en résulte à la fois des effets neuroprotecteurs mais également des effets plus délétères.

### 1. Aperçu du système neuro-immunitaire : implication de la microglie

#### 1.1. Origine des cellules microgliales

Bien qu'il y ait consensus sur l'origine myéloïde de la microglie, à l'inverse des neurones, astrocytes et oligodendrocytes qui eux sont issus du neurectoderme, la nature exacte des progéniteurs microgliaux est toujours controversée. Deux origines distinctes ont néanmoins

été mises en évidence : les macrophages du sac vitellin (lieu d'hématopoïèse), qui vont migrer et envahir le cerveau durant le développement fœtal, puis plus tardivement les monocytes de la moelle osseuse qui vont coloniser le cerveau au cours de la période périnatale (Figure 11) (pour revue : Ginhoux et al., 2013).



**Figure 11** Origine des cellules microgliales. Les macrophages primitifs quittent le sac vitellin pour coloniser le neuro-épithélium à E9.5, s'étendent dans l'ensemble du cerveau en développement, puis prolifèrent localement durant la période périnatale pour former la microglie résidente du cerveau adulte. La formation de la BHE à E13.5 empêche la contribution des monocytes issus de l'hématopoïèse hépatique à la formation de cette microglie. A l'inverse, les monocytes issus de la moelle osseuse y participent dans des proportions limitées durant les premiers stades du développement post-natal. De même, la réponse neuro-inflammatoire chez le sujet adulte peut, dans certaines situations pathologiques, mettre en jeu des monocytes circulants qui acquerront un phénotype de cellule microgliale à forte activité phagocytaire (extrait de Ginhoux et al., 2013).

Il existe une certaine hétérogénéité dans la distribution des cellules microgliales. Estimées à environ  $3,5 \cdot 10^6$  cellules chez le cerveau de souris adulte, la proportion de cellules microgliales varie de 5% dans le cortex à 12% dans la substance noire. La morphologie de ces cellules varie également en fonction de leur localisation ce qui suggère des différences fonctionnelles (Lawson et al., 1990). L'augmentation du nombre de cellules microgliales, également appelée microgliose réactionnelle, est un processus qui se retrouve dans toutes les situations neuropathologiques et qui reflète une activation microgliale (Glass et al., 2010). Savoir si

cette augmentation résulte d'une prolifération de cellules microgliales résidentes ou provient d'une infiltration monocytaire est une question à laquelle il est difficile de répondre. L'utilisation de modèles murins chimériques (moelle osseuse irradiée, marquée et transplantée afin de distinguer les monocytes infiltrés de la microglie résidente) a montré une infiltration monocytaire suite à des lésions cérébrales (Mildner et al., 2007). Néanmoins, ces modèles introduisent un biais dans l'étude de l'infiltration compte tenu de la rupture de la BHE induite par l'irradiation (Diserbo et al., 2002 ; Li et al., 2004 ; Ransohoff, 2007). Des modèles de parabioses, dits plus physiologiques, ont quant à eux souligné l'absence d'infiltration monocytaire consécutive à une dénervation ou suite à une dégénérescence neuronale (Ajami et al., 2007). Bien que dans la plupart des situations neuropathologiques, la microgliose réactionnelle soit dû à la prolifération des cellules microgliales résidentes, il a toutefois été montré qu'une origine monocytaire peut en être partiellement la cause, notamment dans la sclérose en plaque, où la BHE est fragilisée (Ajami et al., 2011).

## 1.2. Fonction de la microglie dans le cerveau sain

### 1.2.1. Elimination des synapses extra-numéraires au cours du développement post-natal

A la naissance, la circuiterie neuronale du système nerveux central est complètement déstructurée de par le trop grand nombre de synapses présentes. Les premières semaines du développement post-natal se traduisent alors par une élimination massive des synapses surnuméraires et du maintien et renforcement de certaines synapses qui seront présentes dans le cerveau mature. L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur CX3CR1, uniquement retrouvé sur les cellules microgliales et qui a pour ligand la fractalkine (CX3CL1), une chémokine libérée par les neurones (Harrison et al., 1998), a mis en évidence une participation de la microglie dans cette purge. (Paolicelli et al., 2011). Un des mécanismes moléculaires sous-jacents les plus étudiés est la voie classique du complément. Les molécules C3b taguent les synapses à éliminer, la microglie, qui exprime son récepteur CR3, va alors éliminer ces synapses par phagocytose (pour revue van Lookeren Campagne et al., 2007). Ce mécanisme a notamment été observé dans le développement post-natal du système rétinogéculé (Stevens et al., 2007). Parce que seulement 50% des synapses surnuméraires sont éliminées dans ce système chez les souris C3 et CR3 KO, d'autres mécanismes moléculaires semblent être impliqués (Schafer et Stevens, 2010 ; Schafer et al., 2012 ).

### 1.2.2. Phagocytose des corps apoptotiques

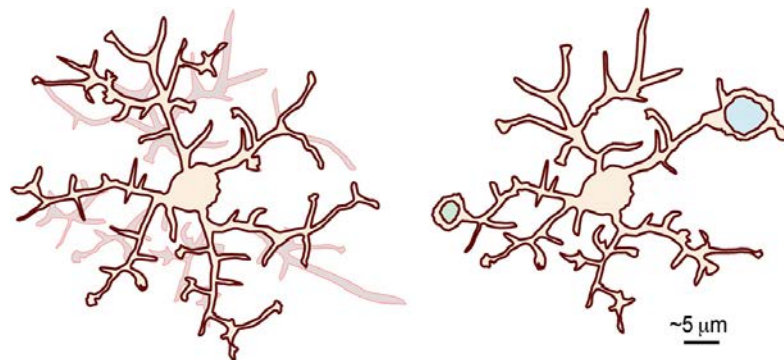
La microglie est le composant majeur du système immunitaire inné dans le cerveau au même titre que les macrophages dans le système périphérique. Un des rôles clés de la microglie dans le cerveau adulte consiste à phagocyter les débris apoptotiques (pour revue : Neumann et al., 2009), ce qui prévient la libération de cytokines pro-inflammatoires induit par ces derniers (Magnus et al., 2001), et donc les phénomènes d'excitotoxicité neuronale qui en résultent (Pickering et al., 2005 ; Simões et al., 2012). Les signaux extracellulaires et récepteurs mis en jeu dans la phagocytose et la clairance des cellules apoptotiques sont très variés et détaillés dans la revue de Napoli et Neumann, 2009. Par ailleurs, il a été observé qu'en présence de cytokines pro-inflammatoires, des prostaglandines sont produites et réduisent considérablement le potentiel de phagocytose des cellules microgliales (Koenigsnecht-Talboo et Landreth, 2005). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, la clairance des agrégats extracellulaire est alors limitée, ce qui peut contribuer à leur accumulation.

### 1.2.3. Plasticité synaptique

En dehors de la phagocytose, la microglie participe au phénomène de plasticité synaptique. Il a en effet été montré que dans des conditions normales, les cellules microgliales peuvent augmenter les courants entrants excitateurs NMDA-dépendants en libérant de la glycine, un co-activateur des récepteurs NMDA (Hayashi et al., 2006). La communication neurone-microglie par les molécules fractalkine/CD200 et leur récepteur microglial respectif CX3CR1 et CD200R (Figure 13) est impliquée dans le maintien de la microglie à un état quiescent (Hoek et al., 2000 ; Cardona et al., 2006). L'altération de cette signalisation est impliquée dans l'activation microgliale, ce qui peut moduler la plasticité synaptique. En effet, les souris déficientes pour CD200 et CX3CR1 présentent toutes deux des altérations de la LTP dans la CA1 de l'hippocampe et une augmentation de l'activité microgliale, qui sont dans le dernier cas associés à des troubles cognitifs (Costello et al., 2011 ; Rogers et al., 2011). Par ailleurs, la microglie est capable de moduler la force synaptique afin de maintenir un niveau de décharge constant. Ce phénomène, appelé « synapse scaling » (pour revue Turrigiano et al., 2008), fait notamment intervenir le  $TNF\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire (Stellwagen et Malenka, 2006). Enfin la microglie, de concert avec les astrocytes, peut moduler la transmission glutamatergique par un mécanisme ATP/P2Y1/mGluR5 dépendant (Pascual et al., 2012). De la même manière l'ATP peut stimuler la libération microgliale de BDNF, activer les récepteurs TrkB neuronaux ce qui induit une inversion des courants anioniques GABAergiques. Ce dernier mécanisme a néanmoins été observé uniquement en situation d'allodynie (Coull et al., 2005).

#### 1.2.4. Echantillonnage de l'environnement

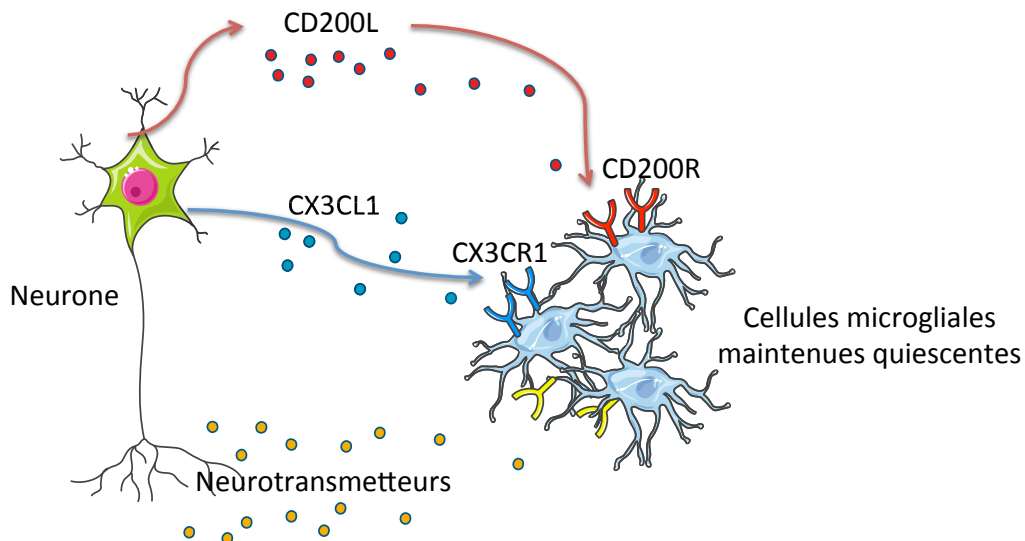
La microscopie bi-photonique permet d'observer les cellules microgliales dans leur environnement. A l'état quiescent, ces cellules sont fortement ramifiées avec un soma quasi-immobile (1-2 $\mu$ m/h) et des prolongements cytoplasmiques qui s'étendent et se rétractent de manière dynamique (1,47 $\mu$ m / min). A l'extrémité de ces filaments peuvent être identifiées des terminaisons bulbeuses, qui permettent de collecter et « scanner » de manière rapide l'environnement proximal par pinocytose (Nimmerjahn et al., 2005). De cette manière, l'intégralité du parenchyme cérébral est balayée en quelques heures (Figure 12).



**Figure 12** Morphologie microgliale chez le sujet sain. Les cellules microgliales sont des cellules extrêmement ramifiées à l'état quiescent. Elles échantillonnent leur environnement proximal grâce aux terminaisons bulbeuses localisées à l'extrémité de leurs prolongements cytoplasmiques. La détection de molécules antigéniques ou d'agrégats protéiques peut entraîner une activation de ces cellules, leur donnant de fait une structure beaucoup moins étalée (extrait de Tremblay et al., 2011)

Les neurotransmetteurs présents dans le milieu extracellulaire peuvent être détectés par la microglie et la maintenir dans un état quiescent, signe que l'activité neuronale est normale (Lee, 2013). A l'inverse, la détection de facteurs solubles anormalement présents (structure bactérienne, virale, fongique) ou présents à des concentrations trop élevées (immunoglobulines, complément, agrégats) s'effectue par différents récepteurs membranaires tels que ceux appartenant à la famille des TLR (Toll like receptor) (Okun et al., 2009), ce qui transforme alors la microglie d'un état de surveillance à un état activé, communément appelé activation microgliale (Kierdorf et Prinz, 2013). De la même manière, la rupture des signaux fractalkine/CX3CR1 – CD200/CD200R, ou encore une altération de l'activité neuronale (Pocock et Kettenmann, 2007 ; Lee et al., 2013), tout deux témoins d'une rupture de l'intégrité neuronale, vont induire une augmentation du niveau d'alerte et d'activation de la

microglie (Figure 13). Il a ainsi été observé qu'en présence de dommages cérébraux, les cellules microgliales proximales puis distales vont très rapidement migrer par chimiotactisme vers la lésion et prendre une morphologie de type amiboïde (Nimmerjahn et al., 2005).



**Figure 13** Différents signaux neuronaux associés au maintien de la microglie dans un état quiescent. CD200L et CX3CL1 (fractalkine) sont constamment libérés par les neurones et se lient respectivement aux récepteurs microgliaux CD200 et CX3CR1 afin de restreindre son état d'activation. Par ailleurs, l'activation des récepteurs cholinergiques, adrénergiques et GABAergiques localisés à la surface des cellules microgliales semble également être associée à une réduction de la réponse neuro-inflammatoire par ces cellules. Le glutamate possède quant à lui à la fois des effets pro et anti-inflammatoires. Une rupture dans ces différents signaux entraîne une levée d'inhibition et le passage de la microglie d'un état de surveillance à un état d'activation. (Lee et al., 2013)

## 2. Les différentes composantes cellulaires de la neuro-inflammation

La neuro-inflammation est un concept émergent apparu depuis une quinzaine d'années et qui, même s'il est souvent employé de manière abusive, se réfère aux réactions inflammatoires mises en jeu par les cellules de l'immunité innée du cerveau (microglie) mais également par les cellules circulantes périphériques infiltrées (lymphocytes, monocytes) (pour une définition plus exhaustive : Graeber et al., 2011).

### 2.1. Activation microgliale

Une rupture de l'homéostasie cérébrale comme observée durant les maladies neurodégénératives, entraîne rapidement une activation microgliale médiée par les TLR

(Rivest, 2009), et qui se caractérise par une réponse contextuelle, extrêmement pléiotrope et versatile car de nature neuro-protectrice et/ou délétère (pour revue Hanisch et Kettenmann, 2007). Dans ce contexte est observée une microgliose réactionnelle associée à une sécrétion d'IL1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ , 2 cytokines pro-inflammatoires impliquées dans les processus de neurotoxicité et de mort neuronale. En effet, elles peuvent induire l'apoptose par des mécanismes caspase 3 dépendants (Allan et Rothwell, 2001), faciliter la production et/ou la réponse glutamatergique et donc les phénomènes d'excitotoxicité associés (Simões et al., 2012 ; Ye et al., 2013) ou encore réduire les signaux de survie neuronale (Venters et al., 1999). Les effets neurotoxiques de l'activation microgliale passent également par une augmentation de l'activité de iNOS, COX-2 et de la NADPH oxydase, ce qui promeut la libération d'espèces réactives de l'oxygène et donc les dommages neuronaux (Bal Price et Brown, 2001 ; Katsuki et al., 2006 ; Block, 2008 ; Jiang et al., 2011). La réponse microgliale peut néanmoins, sous certaines conditions, être neuroprotectrice. En effet, la sécrétion d'IL-4 ou de faibles quantité d'IFN $\gamma$  par la microglie activée peut induire la neurogenèse et l'oligodendrogenèse via l'IGF-1 (Butovsky et al., 2006). Par ailleurs, la microglie peut éliminer les synapses ou dendrites altérées par phagocytose, ce qui fait également intervenir les molécules de CMH de type I (Thams et al., 2008). Ces réponses sont nécessaires en présence d'une mort neuronale intense car elles permettent de faire de l'espace et de former de nouvelles connexions neuronales réduisant alors les conséquences délétères de la lésion.

## 2.2. Activation astrocytaire

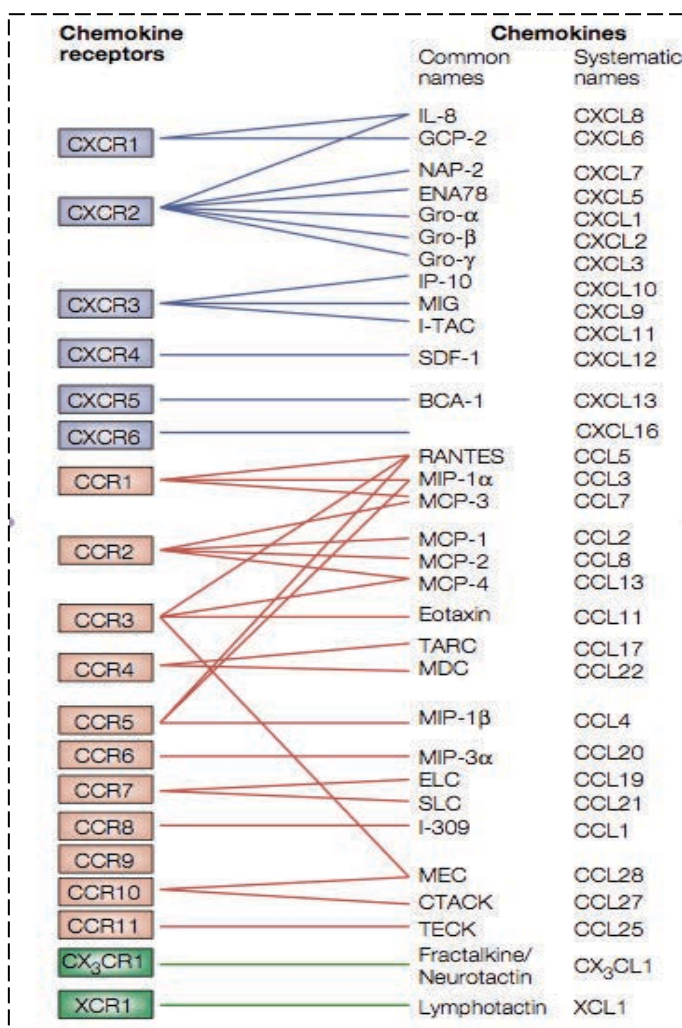
Les astrocytes, cellules de soutien des neurones, sont les principales cellules gliales du cerveau et participent à plusieurs systèmes homéostasiés. Ils modulent notamment la sécrétion/recapture de transmetteurs et par ce biais l'activité neuronale et la coordination d'un réseau synaptique, régulent le pH extracellulaire, le métabolisme énergétique et ionique, et composent la BHE. De plus, à la suite d'une lésion neuronale, les astrocytes sont les principaux constituants de la cicatrice gliale (Sofroniew et Vinters, 2010). Un dysfonctionnement de ces cellules peut donc avoir des conséquences délétères pour le SNC.

Les astrocytes ne sont pas à l'origine de la réponse neuro-inflammatoire mais font suite à l'activation microgliale. En effet, ils sont incapables de répondre au LPS (lipopolysaccharide) alors que l'IL1 $\beta$ , précocement produite par la microglie, peut induire une astrogliose et l'expression de la GFAP, un marqueur d'astrocyte activé (Lee et al., 1993 ; Herx et al., 2001 ; John et al., 2004). De plus, dans différents modèles de neurodégénérescence, la cinétique de

l'activation astrocytaire est décalée par rapport à celle de la microglie (McCann et al., 1996, Colburn et al., 1997). Une fois activés, les astrocytes peuvent donner naissance à une vague calcique qui se propagera le long du réseau astrocytaire et permettra d'activer les cellules microgliales plus éloignées (Liu et al., 2011). Par ailleurs, ils peuvent moduler l'activité microgliale via la libération de TGFβ et réduire les effets neurotoxiques (Ramírez et al., 2005). Enfin, ils participent au phénomène de réparation cellulaire en libérant des facteurs neurotrophiques (CNTF, IGF-1), sous l'effet de l'IL1β microglial (Herx et al., 2000 ; Mason et al., 2001).

### 2.3. Infiltration lymphocytaire et sécrétion chémokinique

#### 2.3.1. Présentation des chémokines



**Figure 14** Récepteurs des chémokines et leur ligand (Proudfoot, 2002).

Les chémokines, classe de molécule appartenant la grande famille des cytokines, comprennent environ 50 membres, sont réparties en sous catégorie CC, CXC, CX3C et C sous la base de leur structure, et réalisent leur action par voie autocrine/paracrine en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G (Charo et Ransohoff, 2006). Chaque chémokine peut se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut lier différentes chémokines, ce qui rend ce système extrêmement complexe et est à l'origine de la diversité d'action de ces molécules (Figure 14).

Les chémokines sont impliquées dans toutes les situations neuropathologiques présentant une composante inflammatoire et leur libération peut être tant microgliale qu'astrocytaire et

neuronale (Gourmala et al., 1997 ; Biber et al., 2008). Elles peuvent moduler la



neurotransmission, être impliquées dans les phénomènes de réparation tissulaire et autres systèmes homéostasiés (pour revues : Cardona et al., 2008 ; Rostène et al., 2011) mais sont davantage étudiées pour leurs effets chémo-attracteurs. Il a ainsi été montré qu'à la suite d'une lésion, les chémokines CXCL10, CCL2, CCL21 ou encore la fractalkine sont surexprimées et libérées par les neurones en souffrance, ce qui permet de recruter les cellules microgliales environnantes et faciliter la réparation tissulaire (Chapman et al., 2000 ; Che et al., 2001 ; Rappert et al., 2004, de Jong et al., 2005). Par ailleurs, les chémokines peuvent promouvoir l'infiltration de leucocytes circulants, ce qui est facilité par leur capacité à pouvoir altérer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) via la surexpression de métalloprotéases dans certaines conditions (Sellebjerg et Sørensen, 2003). De la même manière, il a été montré que les chémokines CCL5 et CXCL12 ainsi que les cytokines IL1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  peuvent induire l'expression endothéliale des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, ce qui permet la diapédèse de monocytes et/ou de lymphocytes à travers la BHE (Cruz-Orengo et al., 2011 ; Lai et al., 2012).

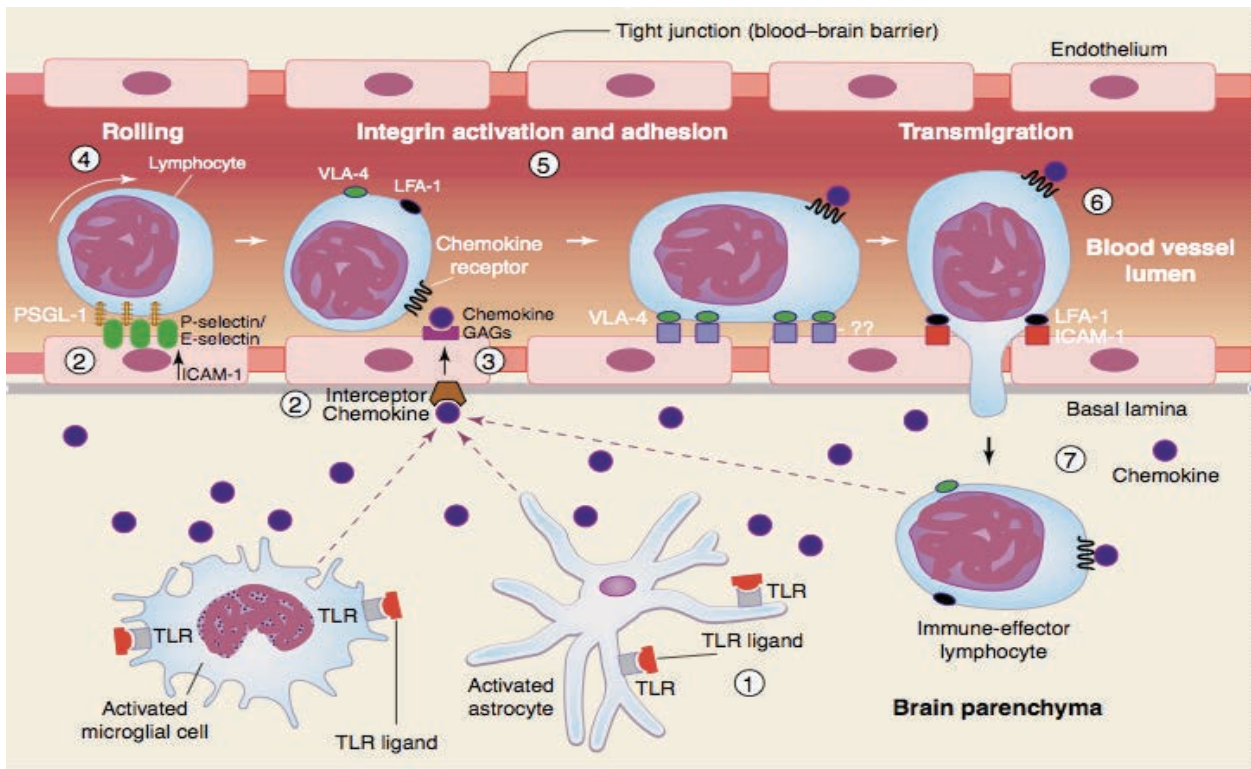
### 2.3.2. Aperçu du rôle physiologique exercé par les lymphocytes au niveau central

La BHE est une unité neuro-vasculaire constituée de cellules endothéliales (reliées par des jonctions serrées), d'astrocytes, de péricytes, de neurones et d'une matrice extracellulaire (Hawkins et Davis, 2005), et qui restreint l'accès des cellules immunitaires périphériques au cerveau. Il existe néanmoins des régions du cerveau qui en sont dépourvues - organes circumventriculaires (organe subfornical, organe vasculaire de la lame terminale, l'éminence médiane et area postrema), les plexus choroïdes et les leptoméninges (arachnoïdes et pie-mère) - et qui constituent des voies de passage privilégiées (Wilson et al., 2010). Dans des conditions physiologiques, les lymphocytes retrouvés dans le LCR sont essentiellement des lymphocytes T mémoire CD4<sup>+</sup> qui ont traversé le plexus choroïde, et l'espace arachnoïde par des mécanismes sélectine P-dépendants (Carrithers et al., 2000). Ces cellules demeurent à la frontière du parenchyme cérébral et ne s'infiltrent pas. Cette localisation leur assure alors une fonction d'immuno-surveillance du cerveau (pour revue : Engelhardt et Ransohoff, 2005). Par ailleurs, les altérations de mémoires spatiales observées chez les souris SCID (Severe combined immunodeficiency), un modèle murin transgénique présentant un système immunitaire adaptatif non fonctionnel, ont mis en évidence une participation des lymphocytes aux processus mnésiques (Kipnis et al., 2004 ; Brynskikh et al., 2008). Les mêmes observations ont été faites après un traitement au FTY720 (un composé qui piège les

lymphocytes dans les organes lymphoïdes) ou après injection d'anticorps dirigés contre l'intégrine VLA-4, réduisant de fait le nombre de lymphocytes dans les méninges. Les mécanismes sous-jacents à cette fonction pro-cognitive médiée par les lymphocytes ne sont pas totalement élucidés mais un rôle de la cytokine IL-4 a été observé (Derecki et al., 2010 ; Derecki et al., 2011 et pour revue Kipnis et al., 2012).

### 2.3.3. Infiltration lymphocytaire

Dans des conditions pathologiques, une infiltration lymphocytaire dans le parenchyme cérébral a été observé, notamment dans des modèles de sclérose en plaque (EAE) (Fletcher et al., 2010). La diapédèse de ces lymphocytes activés met alors en jeu une surexpression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 qui pourront respectivement s'associer aux intégrines LFA-1 et VLA-4 lymphocytaires surexprimées elles aussi (Figure 15 et pour revue : Engelhardt et Ransohoff, 2005 ; Wilson et al., 2010). De même la surexpression des chémokines et de leurs récepteurs va être impliquée. Il a par exemple été montré que CCL5, en agissant sur les récepteurs CCR5 lymphocytaires, facilite leur migration à travers un modèle de barrière in-vitro (Ubogu et al., 2006). De même, la surexpression lymphocytaire de CCL3 permet la migration de ces cellules à travers le cerveau de patients atteints de la MA en agissant sur les récepteurs CCR5 endothéliaux (Man et al., 2007). Les fonctions et conséquences de cette infiltration lymphocytaire sur la physiopathologie restent à ce jour mal connues et dépendent du contexte physiopathologique. Dans un modèle murin de maladie de Parkinson (MPTP), il a néanmoins été observé une réduction de la mort des neurones dopaminergiques après injection de MPTP dans des lignées déficientes en lymphocytes T matures ( $\text{TCR}\beta^{-/-}$  et  $\text{Rag}^{-/-}$ ). L'injection de MPTP facilitant l'extravasation des lymphocytes, ces résultats mettent en exergue des conséquences délétères de l'infiltration lymphocytaire cérébrale (Brochard et al., 2009).



**Figure 15** Mécanisme potentiel de diapédèse lymphocytaire à travers la BBE. Engagement des TLR dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ), par la microglie et les astrocytes (1) ; ces cytokines vont promouvoir la libération de chémokines (cercle violet) et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Sélectine E,P) (cercle vert) (2). L'élévation locale des niveaux de chémokines et leur libération à travers la BBE (3), attire les lymphocytes circulants qui expriment leur récepteur. Ces derniers se fixent alors faiblement sur l'endothélium par interaction faible avec les sélectines (4). Le flux lymphocytaire est alors ralenti (rolling) avant d'être complètement stoppé dû à la fixation des intégrines lymphocytaires LFA-1 / VLA-4 sur les immunoglobulines ICAM-1 et V-CAM de la paroi endothéliale, toutes surexprimées dans ces conditions (5). Les lymphocytes migrent alors au travers de la paroi endothéliale (6) et se retrouvent dans le parenchyme cérébral sur le site de production de chémokines (chimiotactisme) afin d'éliminer l'agent initiateur de cette réponse (Ubogu et al ; 2006).

## Chapitre 3 : Aspects neuro-inflammatoires de la maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par la présence conjointe de plaques neuritiques extracellulaires, composées majoritairement d'agrégats d'A $\beta$ , et d'une dégénérescence neuro-fibrillaire (DNF), constituée d'une accumulation intra-neuronale de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées. Parallèlement à ces deux lésions, il existe une composante inflammatoire de la MA comme en témoigne l'accumulation d'astrocytes et de cellules microgliales activées autour des plaques neuritiques (Serrano-Pozo et al., 2013) ou encore l'augmentation des niveaux de cytokines et chémokines dans le LCR et le parenchyme cérébral des patients (Ojala et al., 2009 ; Corrêa et al., 2011). L'hypothèse de la cascade amyloïde suggère que l'oligomérisation du peptide A $\beta$  puis sa fibrillation en plaque est un événement précurseur de la MA qui est à l'origine de l'hyperphosphorylation de Tau et de sa nucléation ainsi que de l'activation microgliale et des processus neuro-inflammatoires. Un dysfonctionnement progressif de l'activité neuronale allant jusqu'à leur mort associé à des déficits cognitifs survient ensuite (Hardy et Higgins, 1992). Cette hypothèse est aujourd'hui remise en question compte tenu notamment de l'absence de corrélation existant entre la présence des plaques neuritiques et les troubles comportementaux ou encore le faible bénéfice cognitif observé sur des essais cliniques centrés sur A $\beta$  (Karran et al., 2011). En ce sens, d'événement secondaire, la neuro-inflammation pourrait très bien être un événement contributeur voire précurseur comme observés dans certains modèles expérimentaux de tauopathie (Yoshiyama et al., 2007). Les conséquences de cette neuro-inflammation sur la physiopathologie de la MA sont également assez controversées. En effet, elle serait neuroprotectrice dans un premier temps dû à la clairance des dépôts amyloïdes par la microglie et les astrocytes (Wyss-Coray et al., 2003 ; Mandrekar et al., 2009). Néanmoins, l'implication de cytokines pro-inflammatoires dans la neurodégénérescence, la réduction de la clairance des plaques A $\beta$  et l'hyperphosphorylation de Tau lui donne également un rôle plus délétère (Wyss-Coray et Mucke, 2002 ; Li et al., 2003). Enfin la composante cellulaire de la neuro-inflammation, l'existence d'une infiltration lymphocytaire et ses conséquences physiopathologiques sont autant d'aspects qui restent partiellement indéterminés dans le cadre de la MA. De même, bien que les liens entre A $\beta$  et inflammation soient plutôt bien décrits, les

relations avec la composante Tau de la MA demeurent à ce jour mal connues et assez peu étudiés.

## 1. Les médiateurs cellulaires de la réponse neuro-inflammatoire dans la MA

### 1.1. La microglie

#### 1.1.1. Mise en évidence d'une augmentation de l'activité microgliale

L'utilisation en tomographie par émission de positon (TEP) du PK-11195, un marqueur d'imagerie qui se lie aux récepteurs aux benzodiazépines (Venetti et al., 2009), permet de visualiser in vivo l'activité microgliale. En association avec le PIB qui est un marqueur d'A $\beta$  (Lockhart et al., 2007), il a été mis en évidence une augmentation de l'activité microgliale dans le cortex frontal, temporal, pariétal et occipital des patients atteints de la MA conjointement à une élévation de la charge amyloïde dans ces mêmes régions (Edison et al., 2008 ; Yokokura et al., 2011). De manière intéressante, dans le modèle de souris transgénique APP-PS1, la quantité de microglie activée augmente avec l'âge et donc se corrèle avec la progression de la pathologie amyloïde (Venetti et al., 2009). De plus, il a été observé une corrélation inverse entre l'augmentation de l'activité microgliale corticale et le score des patients au MMSE alors même qu'aucune association entre MMSE et charge amyloïde n'existe (Edison et al., 2008), ce qui suggère une participation de l'activité microgliale dans les dommages neuronaux (Edison et al., 2008). Par ailleurs, l'augmentation de l'activité microgliale chez certains patients MCI tend à démontrer qu'elle pourrait être un événement précoce de la MA (Okello et al., 2009).

#### 1.1.2. Implication dans la clairance du peptide amyloïde

Les cellules microgliales expriment à leur surface pléthore de récepteurs susceptibles de se lier au peptide A $\beta$ , et pouvant participer à la clairance des formes solubles et agrégées du peptide par phagocytose. La présence et la formation continue de dépôts amyloïdes centraux laisse alors penser à une incapacité de la microglie à éliminer ces derniers, ce qui pourrait s'expliquer par une altération de son potentiel de phagocytose.

##### 1.1.2.1. Récepteurs microgliaux au peptide amyloïde

Les Toll-like receptors (TLR), exprimés à la surface des cellules gliales et neuronales, sont les principaux récepteurs impliqués dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée (Kawai et al., 2007). Une colocalisation de TLR4 et des plaques A $\beta$  dans le cortex entorhinal des patients atteints de la MA a été observé, ainsi qu'un rôle de TLR4, en association avec

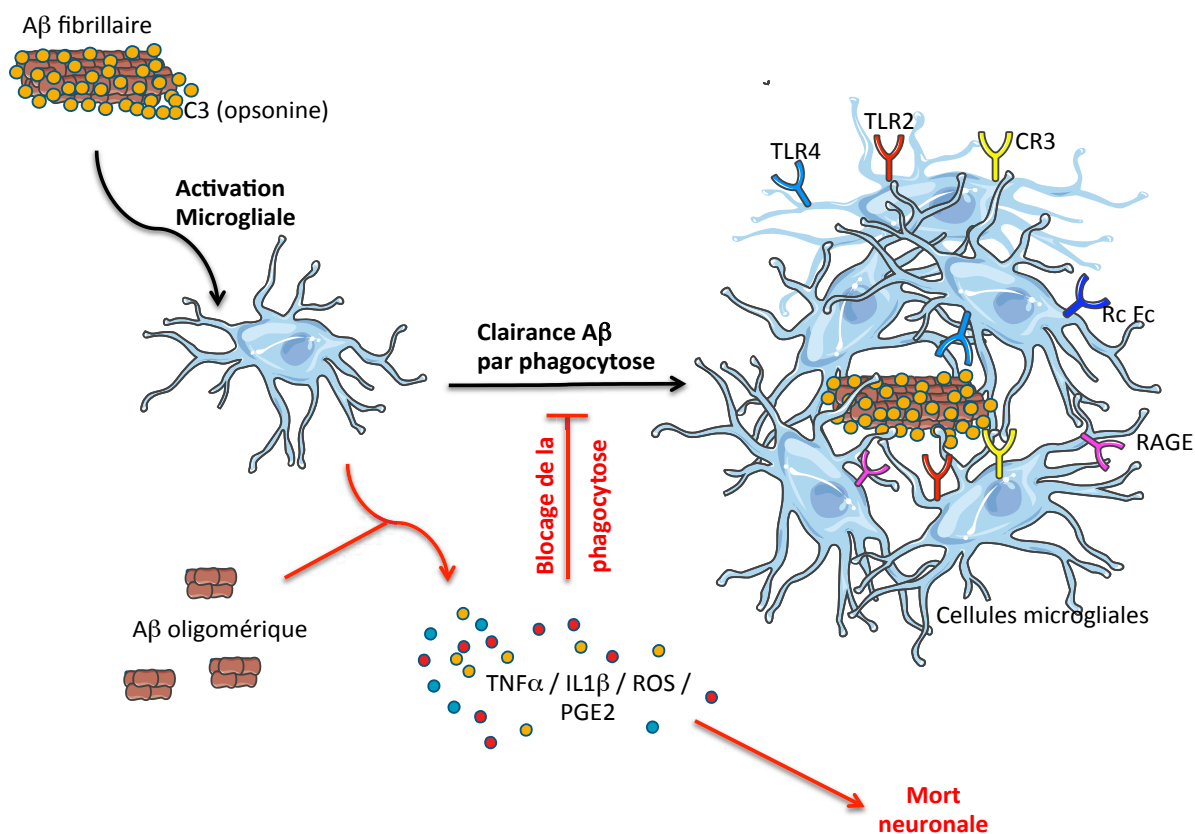
CD14 et MD-2 dans l'activation microgliale induite par A $\beta$ . (Walter et al., 2007). La recapture d'A $\beta$ 1-42 oligomérique a été évaluée dans des cultures de cellules microgliales et a permis de mettre en évidence une implication de TLR4 mais aussi TLR2, TLR9, le corécepteur CD14 et les récepteurs scavengers dans la phagocytose d'A $\beta$  (Tahara et al., 2006). Par ailleurs, dans le cadre d'une immunothérapie dirigée contre le peptide amyloïde, le complexe immunitaire A $\beta$ -anticorps peut être pris en charge par les récepteurs Fc microgliaux et ainsi être phagocyté, ce qui participe à la clairance des plaques neuritiques dans ce contexte (Bard et al., 2000). Enfin le récepteur microglial CR3, ligand de l'opsonine C3, semble également être impliqué dans la phagocytose et la clairance d'A $\beta$  puisque des niveaux plus élevés d'A $\beta$ 1-42 fibrillaires sont retrouvés chez les souris invalidées pour CR3 et C3 (Fu et al., 2012).

#### 1.1.2.2. Mise en évidence d'un dysfonctionnement de la fonction de phagocytose des cellules microgliales

L'injection intra-hippocampique de LPS, un polysaccharide antigénique bactérien utilisé pour initier une neuro-inflammation via les récepteurs TLR2/4 microgliaux, a mis en évidence une réduction de la charge amyloïde sans effet sur les plaques neuritiques dans des modèles APP et APP-PS1. (Dicarlo et al., 2001 ; Herber et al., 2004). Ces résultats témoignent d'une inefficacité de la microglie à éliminer les espèces insolubles d'A $\beta$ . En effet, chez les souris APP23 âgées de 18 à 23 mois, un grand nombre de cellules microgliales activées est observé dans la proximité des plaques neuritiques. Toutefois, ces cellules sont incapables de les phagocyter alors même qu'elles en ont l'aptitude comme le montre la surexpression de la macrosialine (CD68) et des récepteurs Fc, 2 marqueurs impliqués dans le processus de phagocytose (Bornemann et al., 2001). A l'inverse de ces études post-mortem, les techniques d'imagerie in vivo ont montré la présence d'A $\beta$  dans le compartiment lysosomal des cellules microgliales localisées autour des plaques neuritiques, sous-tendant une certaine activité phagocytaire (Bolmont et al., 2008). Par ailleurs, cette même étude a révélé qu'en présence de ces plaques, les cellules microgliales activées migrent rapidement autour d'elles et les encerclent. Une interphase microglie/amyloïde très dynamique se crée, notamment grâce à la mobilité très importante des prolongements cytoplasmiques, dans le but de maintenir la taille de ces plaques à défaut de les éliminer (Bolmont et al., 2008). La fonction de phagocytose de la microglie est donc limitée mais toujours fonctionnelle. En effet, l'utilisation d'agonistes de PPAR $\gamma$  (pioglitazone) par exemple est associée in vivo et in vitro à une augmentation de

l'expression du récepteur de surface CD36 et de la phagocytose d'A $\beta$ , entraînant de fait une réduction de la charge amyloïde et des altérations comportementales (Heneka et al., 2005 ; Yamanaka et al., 2012). La réduction de la fonction de phagocytose des cellules microgliales peut alors être la conséquence d'une répression de cette fonction, notamment par la libération de cytokines pro-inflammatoires produites par cette même microglie (Koenigsknecht-Talboo et Landreth, 2005 ; Pan et al., 2011).

Le rôle de la microglie dans la MA et plus particulièrement vis à vis de la pathologie amyloïde est donc complexe et peut être vu comme biphasique (Figure 16) (Mizuno et al., 2012). Un rôle neuroprotecteur dans un premier temps assuré par sa capacité à phagocyter le peptide amyloïde et donc à augmenter la clairance des formes fibrillaires d'A $\beta$ . Dans le même temps, l'activation microgliale induite par A $\beta$  va s'accompagner de la libération de cytokines pro-inflammatoires qui vont d'une part réprimer l'activité phagocytose de la microglie, et d'autre part exercer des effets neurotoxiques sur l'intégrité neuronale et la plasticité synaptique. Par ces dernières fonctions, l'activité microgliale présente des effets beaucoup plus délétères. L'enjeu des thérapeutiques actuelles est donc de promouvoir les effets bénéfiques de la microglie et de sa fonction de phagocytose, sans induire la libération excessive de cytokines pro-inflammatoires.



**Figure 16** Rôle biphasique de la microglie dans la MA. La présence d'Aβ sous forme fibrillaire augmente l'activité des cellules microgliales. Ces dernières se disposent alors autour des plaques et, grâce aux différents récepteurs membranaires (TLR2, TLR4, CR3, récepteurs au Fc) peuvent les phagocytter, ce qui participe à leur clairance. La phagocytose de ces plaques est de plus facilitée car « taguées » par l'opsonine C3, ligand du récepteur CR3 microglial. Cette activation microgliale s'accompagne néanmoins de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, amplifiée par la signalisation RAGE/NFκB, et la présence des formes oligomériques d'Aβ dites plus toxiques. Il en résulte d'une part une inhibition de la phagocytose, notamment dû à PGE2, et d'autre part une mort neuronale, ce qui fait davantage participer IL1β, TNFα ou encore les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

## 1.2. Les astrocytes

La caractérisation post-mortem des cerveaux de patients atteints de la MA a révélé une augmentation de l'expression de S100β, un marqueur d'activation astrocytaire (Van Eldik et Griffin, 1994 ; Sheng et al., 1994). Par ailleurs, des études d'imagerie in vivo ont mis en évidence, à l'instar de ce qui est observé pour les cellules microgliales, une astroglie dans le cerveau de patients MCI, en association avec Aβ fibrillaire (Carter et al., 2012). Cette astroglie peut survenir avant l'apparition de ces lésions, comme observée dans une étude de cohorte (Wharton et al., 2009), faisant alors de l'activation astrogliale un phénomène précoce



et corrélé au développement de la MA. Des signaux chémo-attractants pouvant être médiés par CCL2 ou CXCL10 sont impliqués dans la migration des astrocytes activés vers les plaques neuritiques, facilitant ainsi leur clairance (Wyss-Coray et al., 2003, Lai et al., 2013). Il a en effet été montré qu'A $\beta$  peut se lier aux astrocytes puis se retrouver dans des vésicules cytoplasmiques et être complètement dégradée (Yamaguchi et al., 1998 ; Wyss-Coray et al., 2003). De plus, une atténuation de l'activité astrocytaire, induit par l'invalidation génétique de la GFAP ou la vimentine, est associée à une quantité deux fois plus élevée de plaques neuritiques chez les souris APP-PS1 (Kraft et al., 2013). Plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans la clairance d'A $\beta$  ont été mis en évidence tels que les récepteurs RAGE, CD36 et CD47 (Jones et al., 2013), ApoE et les récepteurs LDLr (Koistinaho et al., 2004), IDE (Leal et al., 2006) ou encore les métalloprotéases telles que MMP9 (Yan et al., 2006). La réaction astrocytaire entraîne un changement dans la fonction des astrocytes et donc une altération de leur fonction physiologique. En effet, parallèlement à l'augmentation de l'expression de GFAP, une réduction de EAAT-2 est observée et avec elle la recapture du glutamate (Simpson et al., 2010). Le niveau d'excitotoxicité s'élève alors, amplifié par la libération de glutamate astrocytaire induit par A $\beta$  (Talantova et al., 2013), ce qui contribue au phénomène de neurodégénérescence. Les astrocytes activés peuvent par ailleurs surexprimer des composants du complexe gamma-sécrétase (préséniline-1, nicastrin) en présence d'une neuro-inflammation comme observée au cours de traumatisme cérébraux (Nadler et al., 2008). Enfin, les astrocytes participent à la libération de cytokines pro-inflammatoires, induisant de fait une altération de la phagocytose microgliale et des dysfonctionnement neuronaux (Koenigsnecht-Talboo et Landreth, 2005 ; Wyss-Coray et Mucke, 2002).

### 1.3. Les neurones

Chez le sujet sain, les neurones libèrent différents signaux afin de maintenir la microglie dans un état quiescent et réprimer son activation. Parmi ces facteurs, on retrouve les cytokines CD200 et la fractalkine qui exercent leur action en se liant aux récepteurs microgliaux CD200R et CX3CR1 (Hoek et al., 2000 ; Cardona et al., 2006). Or il a été observé une réduction de l'expression neuronale de CD200 dans les régions du cerveaux affectées par la pathologie Alzheimer (Walker et al., 2009). De la même manière, une réduction de la fractalkine a été retrouvée dans le cortex et l'hippocampe de souris APP (Tg2576) (Duan et al., 2008). La rupture de ces signaux contribuent alors à l'activation microgliale et la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire dans le cerveau de patients atteints de la MA.

## 1.4. Les Lymphocytes

### 1.4.1. Mise en évidence d'une réponse lymphocytaire

Dans le cerveau de sujets sains, les lymphocytes sont uniquement retrouvés dans le LCR et possèdent un rôle d'immuno-surveillance (Engelhardt et Ransohoff, 2005). A l'inverse, plusieurs études ont mis en évidence une infiltration lymphocytaire dans le parenchyme cérébral de patients atteints de la MA (Itagaki et al., 1988 ; Rogers et al., 1988, Togo et al., 2002). De plus, la présence d'A $\beta$  peut induire une activation des lymphocytes T circulants (Monsonogo et al., 2003 ; Pellicanò et al., 2012). En effet, des anticorps naturels dirigés contre les formes toxiques d'A $\beta$  ont été retrouvés dans le plasma et le LCR de patients (Britschgi et al., 2009). Ces résultats suggèrent alors une immunogénicité du peptide amyloïde et une participation des lymphocytes à la réponse neuro-inflammatoire mise en place dans la MA.

### 1.4.2. Lymphocytes et clairance du peptide amyloïde

Une corrélation inverse a été observée entre le nombre d'anticorps associés aux plaques amyloïdes et la densité de ces plaques dans le cerveau de patients atteints de la MA (Kellner et al., 2009), suggérant un rôle bénéfique des lymphocytes dans la clairance des agrégats d'A $\beta$ . En effet, une immunisation active d'A $\beta$ 1-42 chez des souris APP-IFN $\gamma$ , induit une infiltration cérébrale de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans la proximité des plaques A $\beta$ , associée à une augmentation de l'expression de marqueurs de phagocytose (SIRP $\beta$ 1, TREM2), et une baisse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ . Une élévation de la clairance des plaques est par ailleurs observée (Fisher et al., 2010). La présence d'A $\beta$  fibrillaire peut donc initier une réponse microgliale d'une part comme énoncé précédemment, les transformer en cellule présentatrice d'antigène (CPA) par une signalisation CD40/CD40L (Townsend et al., 2005), ce qui libère en retour différents signaux cytokiniques permettant l'infiltration de lymphocytes T. Ces lymphocytes participent alors à la clairance des plaques neuritiques notamment en augmentant le potentiel de phagocytose des cellules microgliales (Fisher et al., 2010). La réponse immunitaire de type adaptative peut en outre s'accompagner d'une production d'anticorps dirigés contre les plaques amyloïdes facilitant alors la phagocytose par un mécanisme ADCC (Antibody dependent cellular phagocytosis). Ces effets prometteurs des lymphocytes sur la clairance des dépôts ont conditionné le développement d'essais cliniques basés sur une immunothérapie anti-A $\beta$ . Alors que le premier d'entre eux a essuyé d'importants effets secondaires, notamment la

survenue de méningoencéphalites chez 6% des patients nécessitant l'arrêt de l'essai (Gilman et al., 2005), d'autres ont mis en évidence une absence de bénéfices cliniques malgré la réduction des plaques amyloïdes (Gilman et al., 2005 ; Salloway et al., 2009). Une meilleure compréhension des relations complexes existantes entre A $\beta$  et les différentes populations lymphocytaires semblent alors nécessaires (pour revue : Wang et al., 2010 ; Dorothée et Aucouturier, 2011 ; Monsonogo et al., 2013).

### 1.4.3. Mécanismes sous-jacents à l'infiltration lymphocytaire dans la MA

L'infiltration des lymphocytes au travers de la BHE fait appel à plusieurs signaux. Il a notamment été observé dans un modèle de BHE in vitro qu'A $\beta$  peut se lier aux récepteurs RAGE et induire l'expression endothéliale de CCR5 par des mécanismes faisant intervenir les kinases ERK, PI3K et JNK. Par ailleurs, la surexpression de CCL3, un ligand de CCR5, dans les lymphocytes circulants de patients atteints de la MA permet leur diapédèse (Man et al., 2007 ; Li et al., 2009). De la même manière, il a été montré que la production microgliale de TNF $\alpha$  peut induire la surexpression du récepteur CXCR2 chez les lymphocytes et faciliter ainsi leur infiltration au travers la BHE (Liu et al., 2010). Enfin, le peptide A $\beta$  peut induire la libération de TNF $\alpha$  par les cellules microgliales, favorisant alors l'expression endothéliales de molécules de CMH de type 1, ce qui est associé à une augmentation de l'infiltration lymphocytaire au travers du cerveau (Yang et al., 2013).

## 2. Composante moléculaire et relations physiopathologiques

La mise en place de processus neuro-inflammatoires dans la MA est une réponse du cerveau lui permettant de maintenir une certaine intégrité, ce qui passe notamment par la clairance d'A $\beta$  et donc d'une activation précoce de la microglie (El Khoury et al., 2007). Il a été observé que cette clairance était limitée dû notamment à la réduction de l'activité de phagocytose des cellules microgliales induit par les formes oligomériques d'A $\beta$  (Pan et al., 2011). Une inflammation chronique s'installe alors compte tenu de l'activation permanente de ces cellules. De phagocytes, les cellules microgliales deviennent des cellules sécrétrices de médiateurs de l'inflammation (cytokines, chémokines) afin entre autre de recruter de nouvelles cellules sur le site, ce qui va néanmoins induire des dommages collatéraux dans les tissus sains. Les différents profils d'activation microgliale rendent ainsi compte de la complexité du rôle de ces cellules dans la MA et des conséquences tantôt bénéfiques, tantôt

délétères de la réponse neuro-inflammatoire vis à vis de la physiopathologie de la MA (Colton et al., 2009 ; Mizuno et al., 2012)

## 2.1. Cytokines

Les cytokines, petites protéines solubles libérées par les cellules du système immunitaire, sont les médiateurs de l'inflammation et ont des effets extrêmement pléiotropes. Dans la MA, elles sont principalement libérées par la microglie et les astrocytes, notamment après leur activation par A $\beta$ , et sont impliquées dans la progression de la pathologie. Une élévation du niveau d' IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TNF $\alpha$  et TGF $\beta$  a ainsi été retrouvée dans le tissu cérébral et le LCR de patients atteints de la MA (Blum-Degen et al., 1995 ; Tarkowski et al., 2002 ; Mrak et Griffin, 2005), de même qu'une corrélation entre la production de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL12, IL1 $\alpha$  et la charge amyloïde dans des cultures organotypiques de cerveau de souris APPsw (Patel et al., 2005). Par ailleurs, la liaison d'A $\beta$  aux récepteurs microgliaux RAGE, induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL1 $\beta$  et TNF $\alpha$  en association avec des dommages neuronaux, une élévation de la charge amyloïde hippocampique et corticale ainsi que des altérations de mémoire spatiale chez des souris APP, lesquelles sont reversées par le blocage des récepteurs RAGE (Fang et al., 2010). Ces résultats témoignent d'une contribution des cytokines pro-inflammatoires dans les processus neurotoxiques et plus largement dans la progression de la MA. En effet, l'IL1 $\beta$  peut induire une altération de la LTP hippocampique et une neurotoxicité via p38 MAPK (Simões et al., 2012 ; Tong et al., 2012) ainsi qu'une hyperphosphorylation de Tau de par l'activation de p38 MAPK et GSK3 $\beta$ , 2 kinases de Tau (Sheng et al., 2000, Li et al., 2003 ; Bhaskar et al., 2010 ; Ghosh et al., 2013). Une contribution d'IL1 $\beta$ , du TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  dans l'augmentation de l'activité gamma-sécrétase et donc de la formation d'A $\beta$  a également été retrouvée (Liao et al., 2004). De même, le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  stimulent l'expression de BACE1 (Yamamoto et al., 2007). Des effets neuroprotecteurs ont toutefois été mis en évidence chez des souris transgéniques qui surexpriment IL1 $\beta$  (Matousek et al., 2012 ; Ghosh et al., 2013). En effet, des souris APP chez lesquelles une surexpression d' IL1 $\beta$  est induite pendant 1 ou 5 mois (3-8mois ; 7-8mois ; 7-12mois ; 11-12mois), présentent une réduction du nombre de plaques amyloïdes dans l'hippocampe associée à une baisse des formes insolubles d'A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42. De la même manière il a été montré que la libération de TGF $\beta$  promeut la clairance d'A $\beta$  en augmentant l'activité microgliale ce qui réduit le nombre de plaques neuritiques dans le parenchyme cérébral de souris APP (Wyss-Coray et al., 2002). Le blocage des récepteurs au TGF $\beta$  de type

2, principalement neuronaux, augmente ainsi la charge amyloïde centrale et la neurodégénérescence chez des souris APP (Tesseur et al., 2006), toutefois, une altération de la signalisation neuronale au TGF $\beta$  a également été associée à une réduction des déficits de mémoire spatiale et des dépôts amyloïdes parenchymateux (Town et al., 2008). Ces exemples mettent en exergue la complexité des effets biologiques des cytokines et la difficulté d'appréhender les conséquences de leur ciblage au cours d'essais thérapeutiques.

## 2.2. Chémokines

Les chémokines sont de petites protéines principalement libérées par la microglie et les astrocytes dans le SNC et dont la principale fonction est de promouvoir la migration de cellules immunes locales et/ou l'infiltration de cellules immunes circulantes (Cf chapitre 2 2.3). Malgré le recrutement de nouvelles cellules dans l'environnement des plaques A $\beta$ , il a été montré que la surexpression de CCL2 chez les souris APP favorise la genèse de dépôts amyloïdes due à une baisse de la clairance associée à une expression de ApoE augmentée (Yamamoto et al., 2005). De plus, une corrélation entre les niveaux de CCL2 et de P-Tau a été retrouvée dans le LCR de patients atteints de la MA (Corrêa et al., 2011). Enfin, l'utilisation de souris CCL3 KO et CCR5 KO chez qui de l'A $\beta$ 1-40 est injectée en icv, révèlent une implication de la signalisation CCL3/CCR5 dans les altérations de l'intégrité synaptique et de mémoire spatiale induit par A $\beta$  (Passos et al., 2009). La réponse chémokinique peut donc participer à la progression de la MA bien qu'il lui ait également été observée un rôle plus neuroprotecteur. En effet, la signalisation CCL2/CCR2 permet un recrutement précoce des cellules microgliales et l'inactivation du récepteur CCR2 chez les souris APP induit une mort prématurée de ces souris en raison d'une élévation de la charge amyloïde centrale associée à une réduction de l'accumulation de cellules microgliales (El Khoury et al., 2007). De même, l'élévation des niveaux de CXCL8 dans le LCR et le parenchyme cérébral des patients pourrait réduire les effets neurotoxiques induit par A $\beta$  (Galimberti et al., 2003 ; Ashutosh et al., 2011).

## 3. Relations bidirectionnelles entre la neuro-inflammation et la pathologie Tau

### 3.1. La pathologie Tau induit une réponse neuro-inflammatoire

Les relations entre la pathologie amyloïde et la mise en place des processus neuro-inflammatoires ont fait l'objet d'intenses investigations. La présence des dépôts amyloïdes extraneuronaux semble ainsi être l'agent initiateur de la réponse neuro-inflammatoire dans la

MA, de par notamment sa capacité à activer la microglie. Il a toutefois été observé dans le cortex et l'hippocampe de patients souffrants de la tauopathie FTDP-17 (démence frontotemporale de type parkinsonien liée au chromosome 17), des cellules microgliales activées autour des neurones atteints de DNF, conjointement à une surexpression de COX-2 et IL1 $\beta$  (Bellucci et al., 2011), ce qui suggère que la seule pathologie tau possède le potentiel nécessaire à la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire. En effet, l'hyperphosphorylation de tau induit par la surexpression de la protéine tau humaine (wt ou mutée) chez le rat au moyen de vecteurs lentiviraux est accompagnée d'une augmentation de l'activité microgliale (Klein et al., 2010 ; Wang et al., 2010b ; Khandelwal et al., 2012). L'analyse transcriptomique de ces rats a par ailleurs révélé la surexpression de différents marqueurs inflammatoires dont certaines chémokines (Wang et al., 2010b). De plus il a été observé que la surexpression d'une forme tronquée de la protéine tau chez le rat, forme retrouvée dans la MA et impliquée dans le développement de la DNF (Zilka et al., 2006), peut activer la microglie et promouvoir la libération d'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  et NO (Zilka et al., 2009 ; Kovac et al., 2011). Enfin, il semblerait que la mise en place de cette réponse neuro-inflammatoire soit un phénomène précoce comme le démontre l'utilisation des souris P301S. En effet dans ce modèle de tauopathie, l'activation microgliale et les altérations de l'intégrité synaptique précèdent la formation de la DNF et l'apparition des premiers signes de mort neuronale (Yoshiyama et al., 2007), sous-tendant une implication des processus neuro-inflammatoires dans l'apparition et la progression de la pathologie tau.

### 3.2. Les conséquences délétères de l'inflammation sur la pathologie tau

Afin d'évaluer les conséquences de la réponse neuro-inflammatoire sur la pathologie tau, beaucoup d'études se sont intéressées aux effets d'une injection de LPS, qui induit une activation microgliale rapide et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Il a ainsi été observé une augmentation de la pathologie Tau chez des souris APP/PS1/Tau, un modèle transgénique qui développe les deux lésions caractéristiques de la MA à la suite d'une injection systémique de LPS (Kitazawa et al., 2005 ; Sy et al., 2011). L'injection intra-hippocampique de LPS chez les souris transgéniques rTg4510 (modèle de pathologie Tau), a par ailleurs révélée une corrélation entre l'activation microgliale hippocampique et corticale, et l'augmentation de la phosphorylation de Tau aux épitopes Ser 199/202 et Ser396 (Lee et al., 2010). Compte tenu du rôle bénéfique exercé par l'injection intracrânienne de LPS chez des souris APP, dû notamment à la promotion de la clairance d'A $\beta$  par la microglie (Herber et al., 2004 ; Herber et al., 2007), ces résultats laissent suggèrent des effets opposés de la

réponse neuro-inflammatoire sur la pathologie Tau et amyloïde. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette hyperphosphorylation de la protéine Tau impliquent principalement une activation de ses kinases. En effet, il a été observé que l'association entre l'augmentation de l'activité microgliale (induit par l'inactivation des récepteurs CX3CR1) et de la pathologie Tau passe par la libération d'IL1 $\beta$  qui active alors p38 MAPK (Baskhar et al., 2010). D'autres kinases peuvent également être impliquées comme ERK, CDK5, ou encore GSK-3 $\beta$  (Kitazawa et al., 2011 ; Baroso et al., 2013). Enfin il a été observé in vitro sur des cultures de neurones que le TNF $\alpha$  peut promouvoir l'agrégation de la protéine Tau via la libération d'espèces réactives de l'oxygène (Gorlovoy et al., 2009). Ces différents processus neuro-inflammatoires semblent donc participer activement à la progression de la pathologie tau. De plus, ils contribuent au développement des altérations cognitives, indépendamment de la présence des deux lésions (Jacewicz et al., 2009, Kohman et al., 2013), ce qui en fait une caractéristique à part entière de la MA.

## Chapitre 4 : La Maladie d'Alzheimer : une maladie multifactorielle

La diminution de l'indice de fécondité et l'allongement de la durée de vie sont les deux phénomènes à l'origine du vieillissement de la population mondiale actuelle, cela se traduit par des effectifs de personnes âgées beaucoup plus importants. Il est estimé que le nombre de personnes âgées de 65 ans ou plus serait multiplié par 3 en 2050 (pour revue Pison, 2009). Ce vieillissement démographique apporte son lot de défis parmi lesquels une augmentation significative du nombre de personnes souffrant de démences, en grande partie causée par la MA. En 2010, 35,6 millions de personnes étaient atteintes par la MA, un chiffre supérieur d'environ 10% aux prévisions précédentes (Ferri et al., 2005). En absence de traitement efficace, ce nombre doublerait tous les 20 ans pour atteindre 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050 (Alzheimer's Disease International Consortium, 2009).

Aujourd'hui, l'étiologie de cette maladie demeure incertaine, toutefois il est clairement établi que l'âge constitue le premier facteur de risque de survenue de la maladie : la prévalence en Europe occidentale passe en effet de 0,9% entre 60 et 64 ans, à 24,8% après 85 ans (Coria et al., 1994 ; Ferri et al., 2005). L'âge n'est cependant pas l'unique paramètre à considérer. En effet, l'âge auquel les premières manifestations cliniques de la MA apparaissent et son développement sont conditionnés par la présence conjointes de facteurs génétiques et environnementaux.

### 1. Facteurs génétiques

La contribution relative de la génétique peut être déterminée par l'étude de cohorte de jumeaux au cours de laquelle la prévalence d'une maladie sera comparée entre des jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ). Dans le cas d'une maladie monogénétique autosomale dominante à transmission mendélienne, le taux de concordance chez des jumeaux MZ sera de 100%, puisqu'ils partagent le même génome, et de 50% chez des jumeaux DZ. Dans le cas d'une maladie exclusivement expliquée par des facteurs environnementaux, ce taux est identique entre les jumeaux MZ et DZ. Un grand nombre d'études longitudinales a été réalisée au sein de telles cohortes de jumeaux et la prévalence de la MA y a été déterminée (pour revue Riih  et al., 1997). Il en ressort une prévalence plus importante chez les jumeaux MZ que chez les jumeaux DZ. Les chiffres diffèrent selon les études mais selon l'étude de



Räihä, 31% des jumeaux MZ sont concernés contre 9% chez les jumeaux DZ (Räihä et al., 1996). Ces études mettent en évidence une composante génétique de la MA, qui pourrait être associée à près de 80% des cas (Gatz et al., 2006) faisant de la génétique le second facteur de risque après le vieillissement de développer la MA. Deux catégories de facteurs génétiques sont toutefois à considérer. On distingue d'une part des mutations sur les gènes APP, PSEN1 et PSEN2 qui sont 3 gènes impliqués dans la synthèse du peptide amyloïde. Il s'agit majoritairement de mutations autosomales dominantes à pénétrance complète, qui concernent environ 0,2-1% des patients Alzheimer. On parle ici de formes familiales de la MA où les premiers symptômes de la maladie se manifestent avant l'âge de 55 ans. La deuxième catégorie de facteurs génétiques fait quant à elle intervenir des mutations à pénétrance incomplète qui, associées à des facteurs environnementaux, favoriseront le développement de la MA.

### 1.1. Formes familiales de la MA

#### 1.1.1. Mutations sur le gène APP

L'investigation de nombreuses familles au sein desquelles existaient de multiples cas familiaux de MA a permis de mettre en évidence une série de mutations sur les gènes APP, PSEN1 et PSEN2 à l'origine de ces formes familiales. Historiquement, les recherches se sont focalisées sur le chromosome 21 pour plusieurs raisons : une prévalence de la MA plus élevée chez les personnes atteintes du syndrome de Down (SD), également appelé trisomie 21 (Davies et al, 1986) ; la découverte de la localisation du gène APP sur le chromosome 21 (Goldgaber et al, 1987 ; Tanzi et al. 1987) et la séquence primaire du peptide amyloïde, issu d'agrégats de patients atteints du SD et de la MA, retrouvée identique (Glennner et al., 1984b). Parmi les mutations du gène APP, on retrouve principalement des mutations faux-sens à proximité des exons 16 et 17 codant pour le peptide amyloïde telle que la mutation London, première identifiée (Goate et al., 1991). Il a également été observé des duplications du gène APP (Rovelet-Lecrux et al., 2006) et quelques rares mutations récessives telles que de légères délétions ou des mutations faux sens (Rogaev et al, 1995 ; Tomiyama et al., 2008). De telles modifications vont promouvoir la synthèse du peptide A $\beta$ , augmenter le ratio A $\beta$ 1-42 /A $\beta$ 1-40 et favoriser la formation de fibrilles, ce qui va avoir pour conséquence un développement plus précoce et plus agressif de la maladie, caractéristique de ces formes familiales. A contrario, il a été observé qu'une duplication du gène APP n'est pas toujours accompagnée du développement de la MA (Hooli et al., 2012). Cela souligne l'existence de facteurs protecteurs (d'origines génétiques ou environnementales) capables de contrebalancer

cette mutation, témoignant du rôle non exclusif des mutations portées sur le gène APP dans le développement des formes familiales de la MA. De plus, à peine plus de 30 mutations sur le gène APP ont été recensées à ce jour et se retrouvent dans moins de 0,1% des cas de MA (voir [www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/](http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/)).

### 1.1.2. Mutations sur les gènes PSEN1 et PSEN2

La très grande majorité des formes familiales de la MA sont la conséquence de mutations sur les gènes PSEN1 et PSEN2 localisées respectivement sur le chromosome 14 et 1. Ces deux présénilines appartiennent à des complexes gamma-sécrétase, lesquels participent à la synthèse du peptide amyloïde par le clivage du précurseur transmembranaire APP dans le cerveau malade (De Strooper, 2003). A ce jour, 185 mutations de PSEN1 identifiées sur plus de 400 familles ont été retrouvées contre 14 mutations de PSEN2, faisant de PSEN1 la cause principale des formes familiales de MA (près de 80%) ([www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/](http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/)). Les mutations retrouvées sur ces 2 gènes sont principalement des substitutions ou de petites insertions/délétions (Sherrington et al., 1995 ; Rogaev et al., 1995). Il en résultera une perte d'activité plus ou moins sévère du complexe gamma-sécrétase favorisant la libération de produits de clivage intermédiaires d'APP tel que A $\beta$ 1-42, une forme pro-agrégative, au détriment d'A $\beta$ 1-40. Le ratio A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 se voit donc augmenté sans modification de la production totale d'A $\beta$  (Chávez-Gutiérrez et al., 2012). L'activité protéolytique de PSEN1 est, comparativement à PSEN2, plus spécifique d'APP (Lai et al., 2003), ce qui pourrait expliquer pourquoi les formes familiales causées par certaines mutation de PSEN1 s'avèrent beaucoup plus agressives (Keller et al., 2010).

Les formes familiales de la MA prennent leur origine dans des mutations portées sur les gènes APP, PSEN1 et PSEN2, tous impliqués dans la synthèse du peptide amyloïde. Ces découvertes, mettant A $\beta$  au centre de la physiopathologie de la MA, ont permis l'émergence de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et Higgins, 1992), ce qui a eu pour conséquence de concentrer l'essentiel des efforts thérapeutiques et des essais cliniques sur la réduction des dépôts amyloïdes.

## 1.2. Formes sporadiques de la MA

### 1.2.1. ApoE $\epsilon$ 4

Comme énoncé précédemment, les premiers symptômes caractéristiques de la MA se manifestent après 65 ans dans le cas de formes sporadiques. La génétique contribue de

manière significative à leurs développements. Parmi les différents gènes et polymorphismes identifiés, l'allèle e4 du gène ApoE, localisé sur le chromosome 19, constitue le facteur de risque le plus élevé et le plus formellement établi. Chez l'homme, ApoE existe sous les 3 isoformes  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ , produits des allèles e2, e3 et e4, dont la différence réside en un changement d'acides aminés en position 112 et 158 :  $\epsilon 2$  (Cys112/Cys158),  $\epsilon 3$  (Cys112/Arg158) et  $\epsilon 4$  (Arg112/Arg158). La prévalence de ces allèles  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  dans la population générale est respectivement de 7-8%, 77-78% et 14-15% (Cedazo-Minguez et Cowburn, 2001). Il a été observé par plusieurs études un risque de développer la MA plus élevé chez les sujets porteurs de l'allèle e4 (Saunders et al., 1993 ; Strittmatter et al., 1993). Contrairement aux mutations sur les gènes APP, PSEN1 ou PSEN2 qui sont suffisantes pour le développement de la MA bien que non nécessaires, la présence de l'allèle e4 n'est ni nécessaire ni suffisante (Gureje et al., 2006). Corder et al., 1993 rapporte un effet dose dépendant pour le développement de la MA lié au nombre de copies de l'allèle e4. En effet, dans son étude la proportion d'individu ayant développé la MA passe de 20% chez les personnes n'ayant aucune allèle e4 (génotype e3/e3 ou e2/e3) à 47% et 91% respectivement chez les personnes hétérozygotes (génotype e3/e4 ou e2/e4) et homozygotes pour l'allèle e4. A ce jour, il est estimé qu'un sujet hétérozygote présente un risque 3 fois plus élevé de développer la MA contre 15 pour un sujet de génotype e4/e4. (Farrer et al., 1997 ; Genin et al., 2011). L'âge de début est également considérablement avancé passant de 84,3 ans  $\pm$  1,3 (génotype e3/e3 ou e2/e3) à 75,5 ans  $\pm$  1,0 (génotype e3/e4 ou e2/e4) et 68,4 ans  $\pm$  1,2 (génotype e4/e4) (Corder et al., 1993). Il a enfin été observé que la présence de l'allèle e4 était corrélée à un déclin cognitif plus rapide (Dik et al., 2000). L'ApoE est une lipoprotéine qui, dans le cerveau, est synthétisée et sécrétée majoritairement par les astrocytes. Elle participe au recyclage du cholestérol et des phospholipides appartenant au compartiment glial vers le compartiment neuronal, ce qui permet la réparation membranaire des neurones lésés et contribue alors à la plasticité neuronale (Lane et Farlow, 2005). Des perturbations du métabolisme central du cholestérol ont été associées au développement de la MA (Bogdanovic et al., 2001), c'est pourquoi la présence de l'isoforme ApoE  $\epsilon 4$ , moins efficace dans le transport du cholestérol, peut limiter les phénomènes de plasticité neuronale et donc contrebalancer trop partiellement le phénomène de neuro-dégénérescence, favorisant alors la MA (Finch et al., 1999). L'isoforme  $\epsilon 2$  assure quant à elle ce rôle de manière beaucoup plus efficace ce qui peut expliquer pourquoi elle constitue un facteur protecteur (Corder et al., 1994). D'autres mécanismes ApoE  $\epsilon 4$ -dépendants concourent à expliquer le rôle joué par

cette isoforme dans le développement de la MA telle que la réduction de la clairance du peptide amyloïde, favorisant la formation des agrégats centraux (Schmechel et al., 1993) ou encore l'absence d'interaction avec la protéine tau, permettant son hyperphosphorylation et donc la formation de DNF (Strittmatter et al., 1994 ; Liraz et al., 2013).

### 1.2.2. Autres facteurs génétiques

Depuis la découverte de ApoE  $\epsilon$ 4 comme facteur de risque génétique de la MA, plus de 500 gènes candidats ont été proposés par les innombrables études d'association réalisées. Compte tenu des odds ratio retrouvés très faibles (sans commune mesure avec ApoE  $\epsilon$ 4), les résultats de ces études n'étaient pas forcément reproduits rendant l'élaboration d'une liste claire des facteurs de risques génétiques impossible. C'est dans ce contexte qu'à partir de méta-analyses, la base de donnée Alzgene a été créée (Bertram et al., 2007 ; Bertram et Tanzi, 2008). Par ailleurs, les analyses génétiques pan-génomique (GWAS pour Genome Wide Association Studies) y ont largement contribué. Ces analyses ont été rendues possibles par l'essor de puces de génotypage à très haute densité contenant jusqu'à plus de 500 000 variants génétiques (SNP). La stratégie repose sur la comparaison de ces SNPs entre les sujets témoins et les patients atteints de la MA, au sein d'études à grande échelle. L'odds ratio est alors calculé et permet d'identifier des facteurs de risque ou protecteurs. A ce jour, une dizaine de gènes a été identifiée comme facteur de risque. De ces études réalisées à partir de 2007, des variants retrouvés sur les gènes ATXN1, CD33, CLU, CR1, PICALM, BIN1, MS4A4E/MS4A6E, CD2AP, EPHA1 et TREM ont été associés aux formes sporadiques de la MA (Coon et al., 2007 ; Bertram et al., 2008 ; Harold et al., 2009 ; Lambert et al. 2009 ; Seshadri et al., 2010 ; Naj et al., 2011 ; Kamboh et al., 2012 ; Cruchaga et al., 2013). Leurs implications fonctionnelles dans le développement de la MA demeurent mal connues mais tous ces gènes semblent intervenir dans des voies métaboliques communes que sont le métabolisme du cholestérol (CLU, ABCA7), le système immunitaire (CLU, CR1, CD33, EPHA1) ou encore le fonctionnement synaptique et l'endocytose (PICALM, BIN1, CD2AP). Une altération de ces voies peut alors favoriser la formation de dépôts amyloïdes et/ou de DNF (voir pour revue Tanzi, 2012 ; Bettens et al., 2013). Une interaction entre BIN1 et Tau a ainsi été observée chez l'homme, de plus BIN1 contribuerait à la toxicité induite par Tau comme semble le montrer une étude réalisée chez la drosophile (Chapuis et al., 2013). La perte de fonction d'ATXN1 permettrait quant à elle une augmentation de l'activité  $\beta$ -secrétase favorisant la clivage d'APP et la formation des espèces A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 (Zhang et al., 2010). La découverte de ces 9 locis, additionnés à ApoE  $\epsilon$ 4, compterait pour 25% des facteurs de

risque génétiques des formes sporadiques de la MA. Afin de découvrir de nouveaux variants génétiques, un recouplement des 4 principales GWAS a été effectué et les résultats, non publiés, ont été présentés à la AAIC (Alzheimer's Association International Conference) de Boston en juillet 2013. 11 nouveaux variants ont été identifiés et se trouvent sur les gènes SORL1, HLA-DRB5, DRB1, SLC24A4, PTK2B, ZCWPW1, CELF1, FERMT2, CASS4, INPP5D, MEF2C et NME8. Certains gènes avaient été préalablement retrouvés comme facteur de risque dans certaines études tel que SORL1 (Miyashita et al., 2013). Il a été observé que sa perte de fonction est associée à une production d'A $\beta$  anormalement élevée contribuant au développement de la MA (Rogaeva et al., 2007). PTK2B, une tyrosine kinase, pourrait contribuer quant à elle à la phosphorylation de Tau. La découverte de ces nouveaux gènes nécessite néanmoins d'importantes investigations ce qui pourrait ouvrir la porte à de nouveaux mécanismes impliqués dans le développement de la MA.

## 2. Facteurs environnementaux

### 2.1. Facteurs de risque

La pénétrance incomplète des différents facteurs de risque génétiques mentionnés précédemment, y compris l'allèle ApoE e4, mets en évidence l'importance de l'histoire du patient et de son environnement dans les formes sporadiques de la MA. Les études épidémiologiques couplées aux études expérimentales ont permis d'identifier certains éléments favorisant l'apparition de la MA. En aucun cas, ces derniers ne peuvent être utilisés comme marqueur diagnostique compte tenu de leurs sensibilités et spécificités largement insuffisantes. Syndrome métabolique, Diabète de type 2 et Accidents vasculaires cérébraux constituent les principaux facteurs de risques non-génétiques connus à ce jour.

#### 2.1.1. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est défini par un ensemble d'anomalies métaboliques comprenant une obésité abdominale, une insulino-résistance, une hypertension artérielle, une hypercholestérolémie et une hypertriglycémie. Au sens de l'IDF (International Diabetes Federation) on parle de syndrome métabolique lorsque 3 au moins de ces critères sont présents chez l'individu (Alberti et al., 2009). Il préfigure plusieurs pathologies graves que sont le diabète de type 2, les troubles cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Des études longitudinales et prospectives ont mis en évidence une association entre le syndrome métabolique dans son ensemble et la réduction des capacités cognitives sans parvenir à observer une incidence plus élevée de la MA (Raffaitin et al., 2009). C'est

pourquoi il semble indispensable d'étudier séparément les constituants du syndrome métabolique.

#### 2.1.1.1. Obésité

Plusieurs études ont démontré qu'une obésité abdominale aux environs de la quarantaine augmente le risque de démence et de MA plus de 30 ans plus tard (Kivipelto et al., 2005 ; Whitmer et al., 2008 ; Profenno et al., 2010) Il est de plus en plus établi que des processus pathologiques ont lieu très précocement dans le cerveau de sujets jeunes (moins de 30 ans), se développent progressivement et conduisent à l'apparition des premiers symptômes de la MA à un âge beaucoup plus avancé (Braak et al., 2011). L'obésité, comme la plupart des facteurs environnementaux à risque, a des répercussions néfastes sur le cerveau qui ont lieu en amont des premières manifestations cliniques mais vont participer activement à leurs développements. Il a ainsi été observé que les personnes obèses présentent une atrophie cérébrale, notamment hippocampique favorisant le déclin cognitif (Jagust et al., 2005). Les mécanismes sous-jacents demeurent mal connus néanmoins la leptino-résistance centrale (perte de sensibilité à la leptine), qui caractérise nombre de sujets obèses, apporte un élément de réponse. En effet, la leptine exerce des fonctions neuro-protectrices par la réduction de la dégénérescence neuronale ou encore de la charge amyloïde centrale (Perez-González et al., 2011 et pour revue Doherty et al., 2011). L'hyperphosphorylation de Tau dans l'hippocampe, observée chez les sujets obèses (Mrak et al., 2009), peut quant à elle être causée par l'insulino-résistance centrale qui s'y développe. En effet, les altérations de la voie insulinerigique peuvent participer au déclin cognitif mais également à l'augmentation de la phosphorylation de Tau (Schubert et al., 2003 ; Schubert et al., 2004 ; Mielke et Wang, 2005). Une étude récente réalisée dans le modèle transgénique THY-Tau22 (modèle mimant le versant Tau de la MA), a toutefois montré qu'un régime obésogène pouvait favoriser l'hyperphosphorylation de tau indépendamment du développement d'une insulino-résistance (voir Leboucher, et al., 2013 en annexe de ce manuscrit).

#### 2.1.1.2. Dyslipidémie

Associé à l'obésité, une dyslipidémie se définit par une augmentation de la concentration de triglycérides, cholestérol et autres lipides dans le sang. Son implication dans la MA est soutenue par la découverte des différents variants génétiques ApoE e4, SORL1, CLU ou encore ABCA7, tous associés tant au métabolisme des lipides qu'au développement des

formes sporadiques. Les études épidémiologiques ont mis en évidence que des taux élevés de LDL et faibles de HDL étaient retrouvés chez les patients Alzheimer (Matsuzaki et al., 2011 ; Warren et al., 2012). Par ailleurs, l'utilisation des statines, un inhibiteur de la HMG-Coa-réductase et donc de la synthèse de cholestérol, serait associée à une diminution du risque de développer la MA même si d'autres études conflictuelles existent (pour revues voir Fonseca et al., 2010 ; McGuinness et Passmore, 2010). La régulation centrale et périphérique du cholestérol sont complètement dissociées compte tenu de l'incapacité du cholestérol lié aux lipoprotéines à traverser la barrière hémato-encéphalique. Une élévation des taux de cholestérol et donc de ses produits de catabolisme peut néanmoins induire un stress oxydant, altérer l'activité des  $\beta/\gamma$ -secrétases ce qui favorise la synthèse de A $\beta$  et de ses formes oligomériques et agrégées. L'expression de ApoE peut également être modifiée et avec elle la clairance d'A $\beta$  (Petenceska et al., 2003, Wu et al., 2003 et pour revue Lane et Farlow, 2005). Les triglycérides peuvent également influencer sur le développement de la MA. Une élévation du taux de triglycéride, pouvant contribuer à la formation des dépôts amyloïdes, est ainsi davantage retrouvé chez les patients atteint de la MA (Razay et al., 2007 Matsuzaki et al., 2011). Ces études mettent ainsi en exergue la nécessité d'un régime alimentaire sain. Un déséquilibre pouvant être la cause de dyslipidémies et participer au risque de développer la MA.

#### 2.1.1.3. Hypertension

Une hypertension chronique au environ de la quarantaine, est associée à l'apparition de troubles cognitifs et de la MA chez le sujet âgé (Shah et al., 2012 ; Alperovitch et al., 2013). Des études longitudinales ont de plus révélé une corrélation entre l'hypertension et la présence de plaques neuritiques, de DNF et d'une atrophie cérébrale (Petrovitch et al., 2000). De plus, une réduction des formes A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42 plasmatiques a été observée chez les patients hypertendus 15 ans avant les premiers signes de démence, ce qui peut être le reflet d'une baisse de la clairance du peptide A $\beta$  (Shah et al., 2012). Ce dernier effet peut s'expliquer par la perte d'intégrité des petits vaisseaux sanguins (présence de microlésions, occlusions) consécutive à une hypertension chronique. Le traitement de l'hypertension (inhibiteur de ACE-1) est quant à lui associé à une réduction de l'incidence de la MA même si d'autres études n'observent aucun effets (Ohrui et al., 2004 ; Qiu et al., 2013 ; Soto et al., 2013)

#### 2.1.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 se traduit par une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie réactionnelle. Il est clairement établi qu'il contribue à l'éthiologie de la MA comme le mettent en évidence plusieurs études (Proffeno et al., 2010 ; Cheng et al., 2011 ; Fei et al., 2013). L'insuline semble jouer un rôle central dans la physiopathologie de la MA et faire le lien avec le diabète de type 2 en modulant le métabolisme de A $\beta$  et la phosphorylation de Tau. Il a été montré dans un modèle amyloïde de souris transgéniques qu'une invalidation génétique des récepteurs neuronaux à l'insuline est associée à une réduction des dépôts A $\beta$  (Stöhr et al., 2013). L'hyperinsulinémie retrouvée chez les patients souffrants de diabète va donc promouvoir l'accumulation d'A $\beta$ . IDE (Insulin Degrading Enzyme) est une enzyme dont le rôle consiste à dégrader tant l'insuline que le peptide amyloïde. Une élévation des niveaux d'insuline va donc rendre l'enzyme moins disponible à dégrader A $\beta$  ce qui favorise alors la formation de dépôts (Shiiki et al., 2004). Enfin il a été montré qu'une altération de la signalisation à l'insuline pouvait inhiber Akt, ce qui augmente l'activité de GSK-3 $\beta$  et donc promeut la phosphorylation de Tau et la formation de DNF (Schubert et al., 2003 ; Schubert et al., 2004). GSK-3b peut par ailleurs être activé par le stress oxydant induit par l'hyperglycémie. L'utilisation prolongée de Thiazolinediones (TZD) ou d'agonistes de Peroxisome Proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) dans le traitement du diabète, améliorent quant à eux la sensibilité à l'insuline et les fonctions cognitives en parallèle d'une réduction des dépôts amyloïdes et de l'hyperphosphorylation de Tau (Searcy et al., 2012 et pour revue Moreira et al., 2013).

## 2.2. Facteurs protecteurs

### 2.2.1. Stimulation environnementale : Education et exercice physique

Plusieurs études ont observé que l'incidence de la MA était plus faible chez les personnes ayant un niveau éducatif élevé que chez les individus ayant quitté le système scolaire précocement (Scarmeas et al., 2006 ; Meng et al., 2012). Lire, apprendre, jouer permet d'entretenir une activité intellectuelle, ce qui ralentit le déclin cognitif et le risque de démence. Ces études font appel à la notion de réserve cognitive. Le concept de réserve cognitive renvoie à la capacité du cerveau à mettre en place des circuits neuronaux compensatoires ou à renforcer des circuits neuronaux préexistants afin de faire face aux processus neuro-dégénératifs ayant lieu au cours du vieillissement et davantage durant la MA. Les premières manifestations cliniques apparaissent alors plus tardivement (pour revue voir Stern et al., 2009 ; Stern et al., 2012). Augmenter sa réserve cognitive par une activité



intellectuelle soutenue diminue donc le risque et la progression de la MA (Lo et Jagust., 2013). La libération de neurotrophines telle que le BDNF ou encore la neurogenèse, tout deux induits par un effort physique, contribuent au développement de la réserve cognitive (Brown et al., 2003). Il a en ce sens été observé que les individus qui pratiquent une activité physique régulière ont un risque plus faible de développer la MA (Rovio et al., 2005). La pratique d'une activité physique régulière est également associée à une réduction du stress oxydant, de la neuro-inflammation, et à une amélioration du métabolisme cérébral, ce qui contribue à prévenir de la MA (voir pour revue Radak et al., 2010). L'exercice physique peut par ailleurs moduler les lésions de la MA. Il a ainsi été observé dans le modèle transgénique THY-Tau22, une réduction de la pathologie Tau associée à une réduction du déclin cognitif chez les animaux ayant la possibilité d'effectuer une activité physique chronique. Une baisse de la dégénérescence des neurones cholinergiques a également été observée (Belarbi et al., 2011). Enfin l'exercice physique est associé à une réduction de la formation des dépôts amyloïdes (Adlard et al., 2005). Il est à noter sur ce point qu'une activité physique volontaire est plus efficace qu'une activité physique forcée (Yuede et al., 2009).

### 2.2.2. Régime alimentaire

L'alimentation est une composante étiologique importante de la MA. Le risque de développer la maladie est fonction de la qualité nutritionnelle. Une alimentation riche en sucre / graisse est ainsi la cause de dyslipidémies et favorisent la MA (Voir paragraphe 2.1.1.2). A l'inverse, un régime de type méditerranéen (riche en fruits, légumes, céréales, huile d'olive et pauvre en viande et produits laitiers) est associé à un risque plus faible de développer la MA et à un déclin cognitif plus lent (Lourida et al., 2013), ce qui peut être expliqué par la quantité importante des vitamines A, C et E ou encore des acides gras polyinsaturés retrouvés. Bien qu'un supplément en ces vitamines n'ait pas été associé à une prévention de la MA (Luchsinger et al., 2003), une méta analyse a mis en évidence qu'une alimentation riche en vitamine A, C et surtout E, était associée à un risque plus faible de développer la MA (Li et al., 2012). Les propriétés anti-oxydantes des vitamines A, C et E permettent de réduire la mort neuronale médiée par le stress oxydant, une composante précoce de la MA (voir pour revue Sayre et al. 2008). En outre, un stress oxydant chronique maintenu à un niveau élevé est associé à une oligomérisation d'A $\beta$  et à des déficits mnésiques (Murakami et al., 2011). Enfin il a été observé in vitro, que ces vitamines peuvent diminuer l'oligomérisation d'A $\beta$  et fragiliser les fibrilles déjà formées (Ono et al., 2004 ; Takasaki et al., 2011). La consommation d'acides gras polyinsaturés et plus particulièrement les  $\omega$ -3 sont associés à une

réduction de la pression artérielle et semblent ralentir le déclin cognitif lié au vieillissement normal (Solfrizzi et al., 2004). Néanmoins, leur rôle dans la prévention de la MA demeure incertaine à ce jour et d'autres investigations semblent nécessaires (Solfrizzi et al., 2006 ; Rönnemaa et al., 2012). Une consommation modérée de vin rouge a également été suggéré comme neuro-protecteur vis à vis de la MA de par les polyphénols contenus (Pasinetti, 2012). Enfin, plusieurs études ont démontré que la consommation de caféine est associé à un ralentissement du déclin cognitif au cours du vieillissement (Ritchie et al., 2007 ; Van Gelder et al., 2007) mais également à un risque plus faible de développer la MA (Maia et de Mendonca, 2002 ; Lindsay et al., 2002 ; Eskelinen et al., 2009).

# Chapitre 5 : Caféine et système adénosinergique dans le cerveau sain

## 1. Historique

La caféine (ou 1,3,7-triméthylxanthine) est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines retrouvée en quantité variable dans les graines, feuilles et fruits de plus de 60 plantes. La caféine consommée est toutefois principalement issue des graines des plants de caféier *Coffea Arabica* et *Coffea robusta* ou encore des feuilles de thé de *Camelia siniensis* (Barone et Roberts, 1996). Il s'agit de la substance psychoactive la plus consommée au monde. Historiquement, les premières consommations de caféine remonteraient au 9<sup>ème</sup> siècle en Ethiopie où un gardien de chèvre nommé Kaldi s'aperçut que ses animaux restaient éveillés la nuit après avoir brouté des caféiers. Il ressentit la même vitalité quand à son tour il consumma ces baies. Cantonnée à l'Afrique puis à l'Arabie jusqu'à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle, la consommation de café gagne la Turquie puis l'Italie et rapidement le reste de l'Europe où elle devient très populaire au cours du 17<sup>ème</sup> siècle. Enfin à la fin du 17<sup>ème</sup> et bien plus encore au cours du 18<sup>ème</sup> siècle, les graines de café se retrouvent sur le continent américain (National geographic, 1999). Plus récemment, les boissons caféinées que sont Dr Pepper™, Coca-Cola™ ou encore Pepsi™ ont été introduites à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et sont devenues très populaires ces 60 dernières années inspirant l'arrivée de boissons énergisantes. Aujourd'hui, 80% de la population mondiale consomme quotidiennement un produit caféiné même si de grandes variations existent selon le pays considéré (Figure 17). Les effets de la caféine sur l'organisme que sont une résistance à la fatigue, une augmentation de la vigilance et de l'attention, sont particulièrement recherchés et expliquent la popularité de ces boissons caféinées. De plus, les trop peu d'effets négatifs recensés à la suite d'une consommation aiguë ou chronique de caféine la rende légale dans tous les pays.

Pays	Adulte (mg/jour)	Pays	Adulte (mg/jour)
Chine	16	Australie	232
Afrique du Sud	40	France	239
Etats Unis	168	Suisse	288
Japon	169	Brésil	300
Royaume Uni	202	Finlande	329
Canada	210	Danemark	390

**Figure 17** Consommation de caféine moyenne pour quelques pays. Ces mesures sont en dessous de la réalité car elles ne prennent pas en compte la quantité de caféine apportée par les boissons cola ou énergisantes (Fredholm et al., 1999).

## 2. Source de caféine et consommation

Le café, qui est la première source de caféine, est aussi la boisson la plus consommée au monde après l'eau. D'autres sources de caféine existent : le thé, les boissons de type Coca-cola, les boissons énergisantes ou encore les produits chocolatés (Figure 18). Chaque tranche de la population (jeunes enfants, adolescents, hommes et femmes) consomme potentiellement au quotidien un ou plusieurs produits caféinés. Cependant, en fonction de l'âge, la caféine sera apportée par des produits différents. En effet, le café, et dans une moindre mesure le thé, est la principale source de caféine chez l'adulte, alors que chez l'adolescent, elle est davantage apportée par les boissons de type cola ou énergisantes, dont la consommation croît de manière fulgurante (Frary et al., 2005). La consommation mondiale de caféine est également très disparate en fonction des pays comme le montre le tableau 1. En France par exemple, la consommation moyenne est de 239mg/jour chez l'adulte ce qui correspond à 2 tasses de 250ml de café et représente 3,4mg/kg/jour pour un individu de 70kg.

Produit	Portion	Quantité de caféine (mg)
<b>Café</b>		
Infusé	250ml	135
Torréfié et moulu, percolateur	250ml	118
Torréfié et moulu, filtre	250ml	179
Instantané	250ml	105
<b>Thé</b>		
Feuille ou sachet	250ml	50
Instantané	250ml	15
vert	250ml	30
<b>Boisson à base de cola</b>		
Cola classique	333ml	43
Cola light	333ml	43
Pepsi	333ml	35
<b>Produits à base de cacao</b>		
Gâteau au chocolat noir	100g	15
Lait au chocolat	250ml	15
<b>Boisson énergisante</b>		
Redbull	250ml	80

*Figure 18* Quantité de caféine contenue dans plusieurs type d'aliments et de boissons. Café et thé sont, avec les boissons énergisantes, les deux principales sources de caféine. Le thé en renferme néanmoins deux fois moins. La teneur en caféine du café varie selon le mode de préparation (mouture du grain, temps d'infusion, température de l'eau). Elle dépend également de la qualité et du type de grain (Barone et Roberts, 1996 ; Harland, 2000).

### 3. Pharmacologie

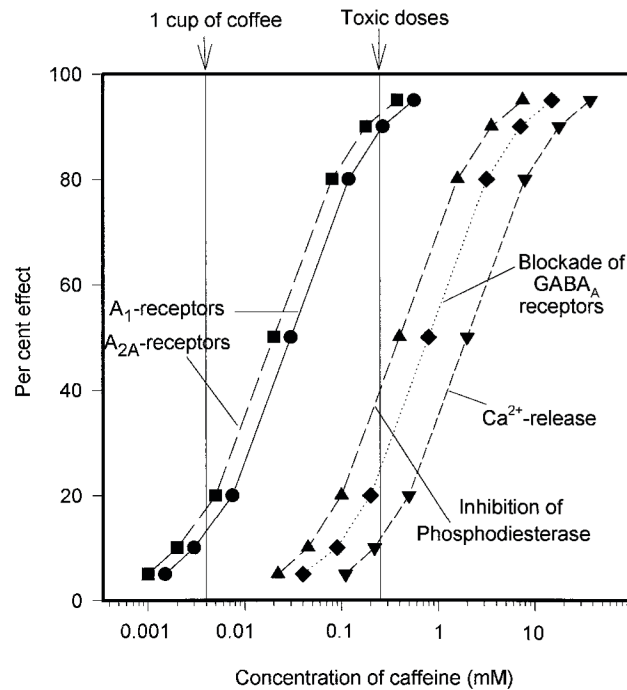
#### 3.1. Pharmacocinétique, métabolisme et demi-vie

La biodisponibilité de la caféine est absolue puisque la quasi-totalité est absorbée. Le pic de concentration plasmatique est atteint 15 à 120 minutes après ingestion, que ce soit par administration orale ou intraveineuse (Blanchard et Sawers, 1983). Pour une personne de 70kg, l'ingestion d'une unique tasse de café apporte une concentration de caféine de 0,4 à 2,5mg/kg ce qui correspond alors à une concentration plasmatique de 1 à 10 $\mu$ M (Bonati et al., 1982). De par ses propriétés hydrophobiques, la caféine traverse les membranes biologiques ainsi que la barrière hémato-encéphalique avec un rapport cerveau/plasma proche de 1 (McCall et al., 1982, Tanaka et al., 1984). Chez l'homme adulte, la demi-vie de la caféine est de 2,5 à 4,5h (Arnaud et al., 1987). Cette demi-vie est considérablement augmentée chez le nourrisson dû à la faible activité du cytochrome P450 (CYP1A2) (Aranda et al., 1979). A l'inverse elle est significativement plus faible chez le sujet fumeur avec une clairance de 155ml/kg/h contre 94ml/kg/h chez le non-fumeur, ce qui s'explique par une activité de CYP1A2 et des FMO (Flavin-containing monooxygénase) augmentée (Chung et al., 2000 ; de Leon et al., 2003). Ces deux dernières enzymes, présentes dans le foie, sont responsables de la clairance de la caféine. La grande majorité (près de 80%) sera déméthylée sur le carbone 3 par CYP1A2 pour former la 1,7-diméthylxanthine appelée également paraxanthine. La déméthylation sur les carbones 1 et 7 a également lieu pour former respectivement la théobromine (3,7-diméthylxanthine) et la théophylline (1,3-diméthylxanthine). Ces deux dernières transformations impliquent davantage les FMO (Chung et Cha, 1997). Il est à noter que les métabolites de la caféine sont biologiquement actifs et participent aux effets de la caféine.

#### 3.2 Actions moléculaires

Une concentration plasmatique de caféine allant jusque 150 $\mu$ M peut se retrouver à la suite d'une consommation dite physiologique de produits caféinés. Au delà, les premiers effets toxiques de la caféine apparaissent. Les cibles moléculaires de la caféine à l'origine de ses effets biologiques doivent donc présenter une affinité compatible avec les concentrations plasmatiques retrouvées dans ces conditions physiologiques. La libération du calcium intracellulaire par une activation des récepteurs à ryanodine (McPherson et al., 1991) ou encore l'inhibition de phosphodiésterases (Smellie et al., 1979), qui ont lieu à des

concentrations de l'ordre du mM, semblent donc exclus. Le seul mécanisme connu à ce jour est le blocage des récepteurs adénoenergiques (Figure 19) (Fredholm et al., 1980).



**Figure 19** Effets de la caféine sur ses différentes cibles pharmacologiques en fonction de sa concentration plasmatique. Seuls les récepteurs adénoenergiques  $A_1$  et  $A_{2A}$  peuvent être inhibés pour des concentrations physiologiques de caféine. A des doses supra-physiologiques, la caféine peut bloquer les phosphodiésterases, les récepteurs GABA ou encore activer les récepteurs à ryanodine et libérer le calcium intracellulaire (extrait de Fredholm et al., 1999)

#### 4. L'adénosine et ses récepteurs

La concentration extracellulaire de l'adénosine dans le cerveau a été estimée à 25-250nM en condition basale, compatible de fait avec une activation constitutive de ses récepteurs (Dunwiddie et Masino, 2001).

##### 4.1. Métabolisme de l'adénosine

###### 4.1.1. Synthèse extracellulaire de l'adénosine

L'ATP/ADP sont co-sécrétés avec d'autres neurotransmetteurs et sont libérés dans le milieu extracellulaire. Leur dégradation locale par CD39, une ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) forme de l'AMP qui sera dégradé à son tour par CD73, une ecto-5'nucleotidase, pour synthétiser l'adénosine extracellulaire (Figure 20 et pour revue, Yegutkin, 2008). Ces enzymes ont un niveau d'expression élevé au sein du cerveau, et

convertissent l'ATP/ADP en adénosine en moins d'une seconde (Dunwiddie et al., 1997). Il a été mis en évidence que ces ecto-nucléotidases sont localisées à proximité des récepteurs  $A_{2A}$  pré-synaptiques afin que le nucléoside néoformé facilite immédiatement la transmission synaptique via leur activation (Cunha et al., 1996). Enfin, la dégradation de l'ATP extracellulaire ne constituerait pas la principale source de l'adénosine dans des conditions basales puisque le blocage des 5'ecto-nucléotidases n'affecte que très modérément la libération d'adénosine (Lloyd et al., 1993). Dès lors, la formation cytosolique d'adénosine est quantitativement plus importante.

#### 4.1.2. Synthèse intracellulaire de l'adénosine

La synthèse de l'adénosine intracellulaire peut être réalisée à partir de la déphosphorylation de l'AMP via une endo-nucléotidase. La formation de l'adénosine est alors le reflet du statut énergétique de la cellule. Lorsque les besoins énergétiques de celle-ci surpassent sa capacité à synthétiser de l'ATP comme c'est le cas au cours d'un stress cellulaire ou d'une ischémie, la concentration cytosolique d'ATP diminue, celle de l'adénosine augmente. Compte tenu de la concentration intracellulaire de l'ATP qui est de l'ordre de 3mM, la conversion d'à peine 1% d'ATP en adénosine multiplierait par 100 la concentration cytosolique du nucléoside (Andiné et al., 1990). La synthèse de l'adénosine peut également être réalisée à partir de l'hydrolyse de la S-adénylhomocystéine (SAH) par la SAH hydrolase (SAHH), ce qui formera, en plus de l'adénosine, la L-homocystéine (Palmer et Abeles, 1979). Cette seconde voie participerait très modérément à la synthèse cytosolique de l'adénosine (Pak et al., 1994).

#### 4.1.3. Transport de l'adénosine et clairance extracellulaire

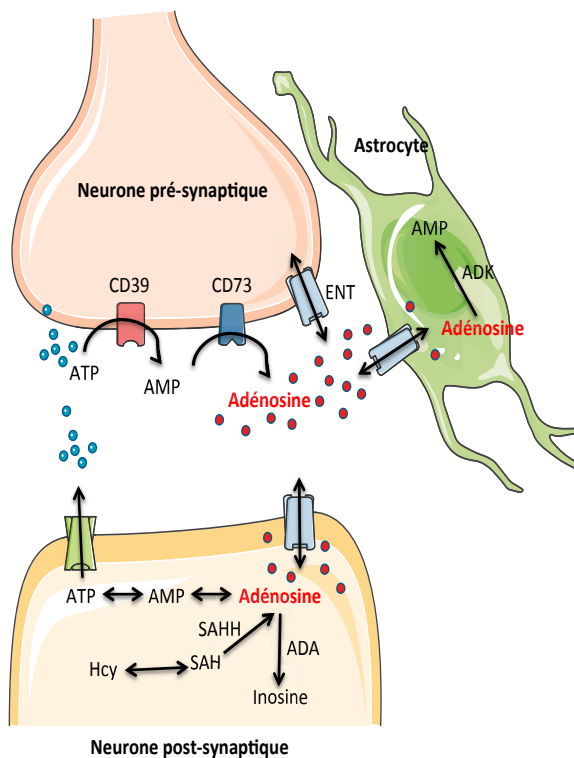
Le transport de l'adénosine à travers la membrane plasmique fait intervenir deux classes de transporteurs de nucléotides que sont les ENT (Equilibrative Nucleotide Transporters) et les CNT (Concentrative Nucléotide Transporters) (Baldwin et al., 1999). A ce jour, il existe 4 isoformes d'ENT. Leur distribution cellulaire et anatomique au sein du cerveau est ubiquitaire et ils sont tous capables de transporter de manière bidirectionnelle l'adénosine en fonction de son gradient de concentration. Les CNT utilisent quant à eux un gradient de sodium (Baldwin et al., 2004). Dans des conditions physiologiques, l'Adénosine Kinase (ADK) dégrade rapidement et de manière continue l'adénosine intracellulaire en AMP et, de manière concomitante, le catabolisme de l'ATP enrichit le milieu extracellulaire en adénosine. Dans ces conditions, la concentration extracellulaire étant plus élevée qu'à l'intérieur du neurone, les ENT vont donc recapturer l'adénosine plutôt que la libérer ce qui explique pourquoi le

blocage de ces transporteurs est associé à une élévation des niveaux extracellulaires d'adénosine (Phillis et al., 1989 ; Dunwiddie et Diao, 1994). Les ENT neuronaux mais également gliaux et plus particulièrement astrocytaires assurent donc la clairance de l'adénosine extracellulaire. Dans des conditions ischémiques ou hypoxiques, le niveau intracellulaire d'adénosine augmente ce qui inverse le gradient de concentration et favorise alors sa libération. Il a néanmoins été observé que le blocage des ENT neuronaux ne réduit pas mais augmente la quantité d'adénosine extracellulaire (Frenguelli et al., 2007), ce qui suggère une recapture de l'adénosine par les ENT au cours d'épisodes d'ischémie ou d'hypoxie (Zhang et al., 2011). D'autres études restent toutefois nécessaires afin de comprendre les sources d'adénosine extracellulaire dans ces conditions.

#### 4.1.4. Elimination de l'adénosine intracellulaire

L'ADK est une enzyme qui phosphoryle l'adénosine en AMP et qui est principalement localisée dans le compartiment glial (Gouder et al., 2004). Cette enzyme module alors à la fois la disponibilité des substrats énergétiques (ATP, ADP, AMP) de la cellule, et la quantité intra- et donc extracellulaire d'adénosine. L'affinité élevée pour son ligand suggère qu'elle joue un rôle prépondérant dans le catabolisme de l'adénosine dans des conditions basales. En effet il a été montré dans une lignée de fibroblaste que la libération d'adénosine dans le milieu était plus élevée lorsque l'ADK n'était plus fonctionnelle que lors du blocage de l'Adénosine Déaminase (ADA), une seconde enzyme impliquée dans la clairance de l'adénosine en inosine (Huber et al., 2001). Le  $K_m$  de l'ADA étant de  $47\mu M$  et donc largement supérieur à la concentration intracellulaire d'adénosine retrouvée dans des conditions physiologiques (Geiger et al., 1986), elle interviendra essentiellement au cours de situations pathologiques où le niveau d'adénosine est plus élevé. Enfin l'adénosine peut être transformé en SAH via la SAHH (Figure 20). Toutefois, cette voie joue un rôle mineure compte tenu de la faible quantité d'homocystéine présent dans le cerveau (Reddington et Pusch, 1983).



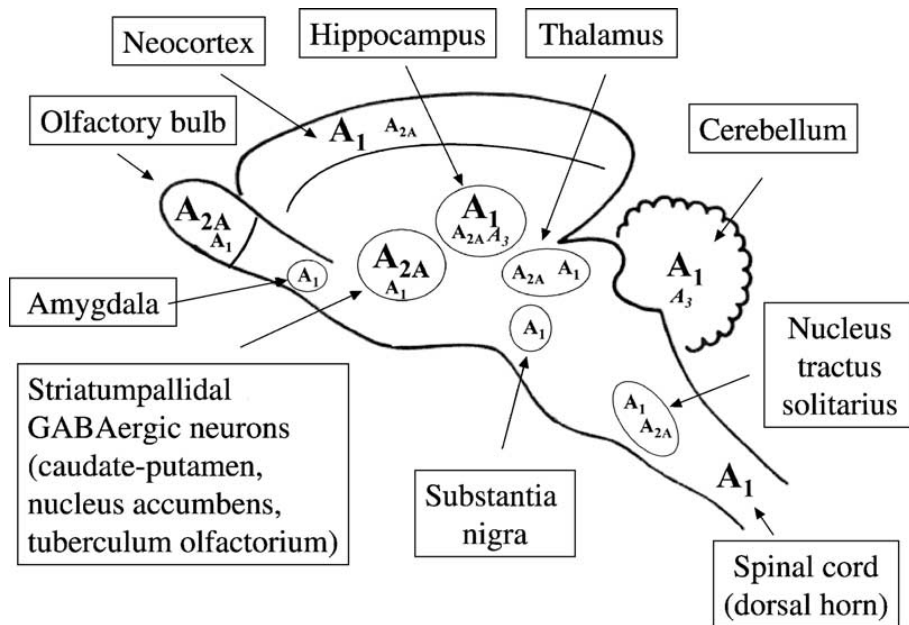


**Figure 20** Synthèse de l'adénosine. La dégradation de l'ATP extracellulaire, colibérée avec les neurotransmetteurs, est dégradée par les ecto-nucléotidases C39/CD73 pour former l'adénosine. Les niveaux d'adénosine extracellulaire étant plus élevés que dans le compartiment cytosolique, l'adénosine est captée par les transporteurs ENT neuronaux et astrocytaires où elle pourra être dégradée respectivement en inosine par l'ADA (Adénosine Déaminase) ou encore en AMP par l'ADK (Adénosine Kinase). Cette dernière voie étant favorisée en condition physiologique. L'adénosine extracellulaire peut également provenir de la libération des stocks intracellulaires, formés à partir d'AMP et, dans une moindre mesure, de la S- adénylhomocystéine (SAH).

## 4.2. Récepteurs à l'adénosine

### 4.2.1. Présentation et distribution cérébrale

Les récepteurs adénosinergiques appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont donc composés de 7 domaines transmembranaires, d'une extrémité Nter extracellulaire et d'une queue Cter cytosolique qui permet leur désensibilisation / internalisation (Perez et Karnik, 2005). Il existe 4 types de récepteurs : les récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub>, qui présentent une forte affinité pour leur ligand avec un Kd de 70 et de 150nM respectivement, et les récepteurs A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub>, beaucoup moins affins pour l'adénosine avec un Kd de 5100nM pour le premier et de 6500nM pour le second (Dunwiddie et Massino, 2001). La localisation cellulaire de ces récepteurs est tant neuronale que gliale, à la fois pré-, post- ou extra-synaptique. Leur distribution neuroanatomique est cependant variable et dépend du type de récepteur. Alors que la densité des récepteurs A<sub>1</sub> est élevée dans les régions corticales, le cervelet et l'hippocampe, les récepteurs A<sub>2A</sub> sont essentiellement retrouvés au sein des neurones GABAergiques du striatum et dans le bulbe olfactif mais également dans l'hippocampe et le cortex à des densités beaucoup plus faibles. Les récepteurs A<sub>2B</sub> et A<sub>3</sub> sont quant à eux faiblement distribués au sein du cerveau et relativement peu étudiés (Figure 21) (pour revue Fredholm et al., 2001 ; Ribeiro et al., 2002).

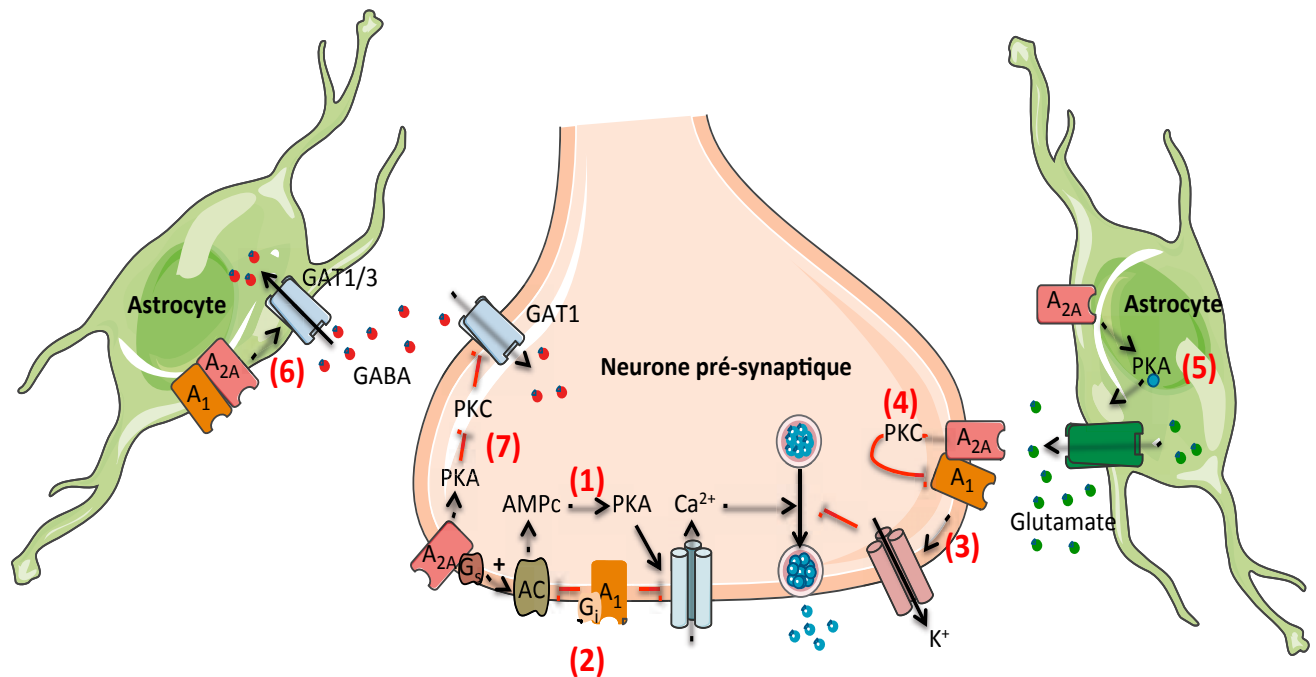


**Figure 21** Distribution neuro-anatomique des récepteurs  $A_1$ ,  $A_{2A}$  et  $A_3$  (extrait de Ribeiro et al., 2002)

#### 4.2.2. Implication dans la plasticité synaptique

L'activation des récepteurs  $A_1$  et  $A_3$  met en jeu des protéines  $G_{i/o}$  qui inhibent l'Adénylate Cyclase (AC) et la formation de l'AMPC, à l'inverse des récepteurs  $A_{2A}$  et  $A_{2B}$  qui sont couplés à des protéines G activatrices de nature  $G_s$  ou  $G_{olf}$  (Linden, 2001). En activant des protéines G inhibitrices, les récepteurs  $A_1$  pré-synaptiques vont promouvoir la libération de potassium et inhiber l'entrée de calcium par le blocage des récepteurs calciques de type N/P et Q (Fredholm et al., 2001), ce qui hyperpolarise le neurone et inhibe la libération de neurotransmetteurs. A contrario, en activant la voie AC / AMPC / PKA, les récepteurs  $A_{2A}$  pré-synaptiques induisent une entrée de calcium, ce qui facilite la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe (Cunha et al., 1995 ; Rebola et al., 2002). La libération de glutamate et de GABA par ces récepteurs semblent quant à elle faire intervenir la PKC par un mécanisme AMPC indépendant (Lopes et al, 2002 ; Cunha et Ribeiro, 2000). Enfin les récepteurs  $A_{2A}$  peuvent être impliqués dans la recapture de neurotransmetteurs. Il a par exemple été observé une réduction de la recapture astrocytaire de glutamate via ses transporteurs GLT-1 et GLAST suite à l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  (Matos et al., 2012). A l'inverse, il a été montré une augmentation de la recapture neuronale et astrocytaire du GABA par les transporteurs GAT-1 et GAT-3 (Cristóvão-Ferreira et al., 2009 ; Cristóvão-Ferreira et al., 2013). Par ces mécanismes, l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  module la libération de

neurotransmetteurs et peut contribuer au phénomène d'excitotoxicité au glutamate en situation neuro-pathologique (Figure 22).



**Figure 22** Effets des récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$  pré-synaptiques dans la libération de neurotransmetteurs. L'activation des récepteurs  $A_{2A}$  neuronaux pré-synaptiques stimule la voie AMPc/PKA, ce qui va favoriser l'entrée de calcium et la libération de neurotransmetteurs comme l'Acétylcholine (1). A l'inverse, les récepteurs  $A_1$  vont inhiber cette voie (2) mais vont également hyperpolariser le neurone via l'activation de courants sortants potassiques (3), concourant aux effets dépresseurs des récepteurs  $A_1$ . L'activation des récepteurs  $A_{2A}$ , hétérodimérisés avec les récepteurs  $A_1$ , peut également stimuler la libération de neurotransmetteurs (Glutamate, GABA) soit en inhibant directement les récepteurs  $A_1$  ou par un mécanisme PKC-dépendant (4). Les récepteurs  $A_{2A}$  astrocytaires sont également impliqués dans la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate, via l'activation de la PKA (5). Enfin les récepteurs  $A_{2A}$  modulent la recapture tant neuronale que gliale des neurotransmetteurs. L'activation des récepteurs  $A_{2A}$  astrocytaires hétérodimérisés, stimule par exemple la recapture du GABA par les transporteurs GAT1/3 (6). De la même manière, les récepteurs  $A_{2A}$  neuronaux vont lever l'inhibition médiée par la PKC sur les récepteurs GAT1 et permettre ainsi la recapture du GABA par les neurones pré-synaptiques.

Le glutamate est un puissant neurotransmetteur exciteur qui exerce ses effets par des récepteurs-canaux de type AMPA et NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou encore des récepteurs métabotropiques (mGluRx). Leur activation conduit à une entrée de sodium et/ou de calcium ce qui dépotarise le neurone et facilite la mise en place d'une LTP, impliquée dans le

renforcement et la plasticité synaptique. Plusieurs études se sont intéressées au rôle de l'adénosine dans ces phénomènes, ce qui met en jeu les récepteurs adénosinergiques post-synaptiques. L'étude des récepteurs  $A_{2A}$  post-synaptiques a ainsi mis en évidence que leur activation induit une LTP AMPA-dépendante dans la CA1 de l'hippocampe via la PKA (Dias et al., 2012). Par ailleurs, il a été observé que la co-activation des récepteurs  $A_{2A}$  et mGluR5 est impliquée dans la mise en place d'une LTP NMDA-dépendante au sein de la CA3 et fait intervenir une élévation de la concentration cytosolique de calcium et la protéine kinase Src (Rebola et al., 2008). Enfin les récepteurs  $A_{2A}$  peuvent trans-activer les récepteurs TrkB (Tropomyosin-related kinase), facilitant alors la transmission synaptique et la LTP induite par le BDNF, son ligand, dans la CA1 (Diogenes et al., 2004 ; Fontinha et al., 2008). A l'inverse, il a été montré que l'activation des récepteurs  $A_1$  post-synaptiques inhibe la mise en place d'une LTP NMDA-dépendante dans la CA1 (De Mendonça et Ribeiro, 2000)

En activant les récepteurs  $A_{2A}$ , l'adénosine facilite donc la libération de neurotransmetteurs dont certains excitateurs tel que le glutamate, et module la plasticité synaptique. Les récepteurs  $A_1$  exercent quant à eux une inhibition tonique de la transmission synaptique. Par ces effets, l'adénosine est un puissant modulateur de l'activité cérébrale.

## 5. Actions centrales de la caféine

La caféine est un antagoniste non sélectif des récepteurs  $A_1$  et  $A_{2A}$ . En inhibant les effets de l'adénosine, la caféine va modifier la libération et la concentration des principaux neurotransmetteurs (Glutamate, Acétylcholine, GABA, catécholamines) dans la fente synaptique, ce qui aura des répercussions sur un certain nombre de fonctions cérébrales. Dans cette partie seront abordées les conséquences d'une consommation habituelle de caféine sur les performances cognitives de l'individu sain. Les effets de la caféine sur le sommeil et psychomoteurs seront également aperçus. Les effets neuroprotecteurs de la caféine dans des situations neuropathologiques ne seront pas traités. Compte tenu du manque de sélectivité de la caféine, les mécanismes d'action sur le cerveau seront disséqués par l'utilisation de modèles murins transgéniques invalidés pour le récepteur  $A_1$  ( $A_1$ KO) et  $A_{2A}$  ( $A_{2A}$ KO) ou d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques.

### 5.1. Performances cognitives

La cognition désigne l'ensemble des phénomènes neurobiologiques impliqués dans différentes fonctions telles que la mémoire, le langage, le raisonnement, l'apprentissage, la résolution de problèmes, la prise de décision, la perception ou encore l'attention.

### 5.1.1. Mémoire et apprentissage

La mémoire est une fonction cognitive complexe qui met en jeu plusieurs structures cérébrales dans lesquelles l'information est encodée puis stockée et enfin remobilisée. La première étape du processus de mémorisation, appelée l'encodage, consiste à conserver les informations acquises au cours de l'apprentissage. Les effets de la caféine sur l'apprentissage ont été étudiés et les résultats obtenus varient en fonction du paradigme expérimental utilisé. Le test du « paired-associated learning » consiste à apprendre un ensemble de mots associés par paire, et de mesurer la capacité de l'individu à retrouver le second mot lorsque le premier lui est donné comme indice, soit immédiatement après l'apprentissage soit après un certain délai. Il a été montré que la caféine n'augmente pas le nombre de mots retrouvés dans les deux cas (Yu et al., 1991 ; Smith et al., 1991). De la même manière, dans des tests de mémoire verbale, où le sujet doit retrouver le plus de mots possible parmi ceux qui lui ont été présentés, beaucoup d'études utilisant des quantités de caféine comprises entre 100 et 400 mg ne voient aucun effet (Landrum et al., 1988 ; Loke et al., 1992 ; Rees et al., 1999) néanmoins une légère amélioration a parfois été retrouvée (Gupta, 1991 ; Jarvis, 1993 ; Riedel et al., 1995).

Il est à noter que les capacités d'apprentissage sont influencées par la concentration de l'individu et donc son niveau d'attention, son humeur, ou encore son niveau d'éveil, or en modifiant ces différents paramètres la caféine peut moduler la mémoire (voir section suivante). Afin de discriminer les effets directs de la caféine sur la mémoire des effets indirects (via effets attentionnels ou autre) des techniques d'imagerie cérébrale comme l'Imagerie par Résonance Nucléaire fonctionnelle (IRMf) couplées aux tests de mémoire verbale ont été utilisées. Il a ainsi été observé que l'activation du cortex fronto-pariétal (qui comprend notamment le cortex cingulaire) et du thalamus, deux régions impliquées respectivement dans l'attention et l'éveil (Foucher et al., 2004 ; Chee et al., 2006), sont mis en jeu par la caféine (Koppelstaetter et al., 2008). Une étude récente a quant à elle mis en évidence une légère association entre l'amélioration de la mémoire verbale par la caféine et l'activation du cortex préfrontal dorsolatéral, une structure impliquée dans la planification des fonctions exécutives (Klaassen et al., 2013). Ces résultats montrent que la caféine pourrait

être impliquée dans l'amélioration des performances cognitives par un mécanisme direct sur la mémoire, indépendamment de ses effets positifs sur l'attention, ce qui semble mettre en jeu une augmentation de la transmission cholinergique (Riedel et al., 1995 ; Botton et al., 2010).

Il existe une grande hétérogénéité dans les résultats des différentes études réalisées qui peuvent s'expliquer par la variabilité de l'âge des participants, des tests expérimentaux, de la difficulté d'avoir des individus contrôles ayant une concentration plasmatique de caféine nulle, ou encore des effets du sevrage précédant les tests (Nehlig et al., 2010). Malgré ces différents biais, ces études démontrent que les effets de la caféine sur l'apprentissage et la mémoire chez le sujet sain existent, bien que modérés.

### 5.1.2. Apprentissage et Vivacité intellectuelle

La chronométrie mentale est une méthode qui consiste à mesurer le temps de réponse (qui correspond à la somme du temps de réaction et d'exécution) face à des stimuli distincts, ce qui traduit la vitesse de l'encodage et du traitement de l'information dans le cerveau. Cette méthode est fortement utilisée pour mettre en évidence des effets liés à l'attention ou encore au niveau d'alerte. Il existe plusieurs types de tests qui diffèrent par la nature et le type de stimulus. Au cours du « simple reaction time task », l'individu doit répondre dès qu'il perçoit l'unique stimulus présent. Plusieurs stimuli peuvent apparaître au cours du test et engendrer soit des réponses différentes en fonction du type de stimulus («choice reaction time task»), soit une réponse pour un seul type de stimulus (« Go / no Go reaction »). Enfin l'individu doit parfois discriminer des stimuli qui se ressemblent (signal long, court, aigu, grave) dans le « discrimination reaction task ».

Des étudiants ont effectué un exercice de lecture d'une durée de 75 minutes, 1h après avoir reçu 100mg de caféine. A l'issue du test, un questionnaire leur a été distribué dans lequel le groupe d'étudiant ayant consommé la caféine se perçoit comme plus éveillé, tonique ou encore concentré (Peeling et Dawson, 2007). Des études ont montré que de faibles quantités de caféine (32-60mg) améliorent la vivacité intellectuelle de manière dose-dépendante (Hewlett et Smith, 2007) ainsi que la concentration (Lieberman et al., 1987). Il a été proposé que les effets psychostimulants de la caféine observés dans nombre d'études puissent s'expliquer par l'annulation des effets négatifs du sevrage précédant les tests (environ 1 nuit)(James et Rogers, 2005). Or il a récemment été démontré au cours de tests d'attention et de vigilance qu'une dose de 2mg/kg de caféine diminue le temps de réaction, le nombre de

réponses erronées et augmente la précision de la réponse de manière identique entre consommateur régulier de caféine ayant été sevré avant l'étude et non consommateur, ce qui réfute alors cette théorie (Smith et al., 2013a). Ces tests d'attention et de vigilance mettent en jeu plusieurs régions du cortex préfrontal ainsi que le cortex cingulaire (Casey et al., 2000 ; MacDonald et al., 2000 ; Milham et al., 2005 ; Aarts et al., 2009), dans lesquels une élévation de la neurotransmission dopaminergique y est retrouvée (Ko et al., 2009). Par ailleurs, une augmentation de l'activité neuronale de ces structures par la caféine a été observée (Koppelstaetter et al., 2008). Les effets attentionnels de la caféine pourraient alors être le résultat du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  (dont l'activation inhibe les récepteurs à la dopamine  $D_2$ ) et donc d'une augmentation de la réponse dopaminergique (Ferré, 1997). Une étude expérimentale réalisée chez le rat a ainsi montré qu'un antagoniste  $A_{2A}$  mime les effets positifs de la caféine sur l'attention (Higgins et al., 2007). De plus, chez le rat hypertendu, un modèle reconnu de trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité, des déficits attentionnels associés à une réduction de la quantité corticale de dopamine sont retrouvés. Il a été observé dans ce modèle que la caféine réduit significativement les troubles de l'attention et normalise la concentration extraneuronale de dopamine par réduction de sa recapture (Pandolfo et al., 2013). Les sujets extravertis sont plus sensibles aux effets de la dopamine dû à des modifications fonctionnelles du système dopaminergique mésolimbique (système de récompense) (Depue et Collins, 1999 ; Smillie et al., 2011 ; Baik et al., 2012). Un antagoniste des récepteurs  $D_2$  chez ces derniers a été associé à une réduction des performances cognitives (Wacker et al., 2006). Il a été mis en évidence que les effets psychostimulants de la caféine sont plus importants chez les sujets extravertis qu'introvertis (Smillie et Gökçen, 2010 ; Smith, 2013b), ce qui semble confirmer que la caféine augmente la concentration et la vivacité par un effet indirect sur la libération de la dopamine, ce qui améliore in fine les performances cognitives du consommateur.

### 5.1.3. Performance cognitive et fatigue

Une des motivations à consommer de la caféine s'explique par sa capacité à maintenir les performances intellectuelles dans des conditions de fatigue. Il a été observé que 200mg de caféine augmente davantage les performances intellectuelles chez des étudiants fatigués que reposés (Lorist et al., 1994). Dans ces conditions, le temps de réponse est réduit et l'encodage de nouvelles informations est amélioré. La caféine prévient alors de la dégradation des performances cognitives induite par la fatigue. Toutefois, ces effets restent limités. En effet, dans des situations de fatigue extrême induite par 2 fois 40h de restriction de sommeil séparée

d'une semaine, la caféine parvient à préserver les performances cognitive simple alors qu'elle ne maintient pas les performances cognitives complexes (Gottselig et al., 2006). Une autre étude a néanmoins montré que 200 ou 300mg de caféine amélioreraient la vigilance, l'apprentissage et la mémoire après 72h de restriction de sommeil chez des soldats de l'US Navy (Lieberman et al., 2002). Ces études montrent que la caféine peut modérément normaliser le déclin des performances cognitives induit par la fatigue.

## 5.2. Sommeil

La quantité extracellulaire d'adénosine suit un rythme circadien et régule l'alternance des phases éveil / sommeil. Sa concentration augmente durant la phase d'éveil et diminue au cours du sommeil (pour revue : Huang et al., 2011). Beaucoup d'individus modèrent leur apport en caféine en fin de journée compte tenu de ses effets délétères vis à vis du sommeil : temps d'endormissement plus élevé / réduction de la qualité et de la profondeur du sommeil (Landolt et al., 1995 ; Drapeau et al., 2006). Ces effets semblent impliquer les récepteurs  $A_{2A}$ . Il a en effet été observé que des doses de 5, 10 et 15mg/kg de caféine augmentent le temps d'éveil chez des souris WT et  $A_1$  KO contrairement aux souris  $A_{2A}$ KO (Huang et al., 2005). Par ailleurs, les individus porteur du polymorphisme c.1083C (génotype C/C) du gène ADORA (codant pour le récepteur  $A_{2A}$ ) sont davantage susceptibles à la détérioration du sommeil induite par la caféine (Rétey et al., 2007). Enfin l'invalidation sélective des récepteurs  $A_{2A}$  localisés dans le noyau accumbens, une structure neuro-anatomique jouant l'interphase entre le système limbique et le système locomoteur (Groenewegen et Trimble, 2007), prévient à la fois des effets psychomoteurs et d'éveil de la caféine (Lazarus et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les effets de la caféine sur le sommeil sont au moins partiellement le résultat d'une stimulation de l'activité locomotrice.

## 5.3. Effets psychomoteurs

Compte tenu de la forte expression des récepteurs  $A_{2A}$  dans le striatum, une structure impliquée dans la motricité extra-pyramidale, les effets psychomoteurs de la caféine pourraient mettre en jeu ces récepteurs. En effet, des études ont révélé que la stimulation motrice induite par la caféine (6,25-25mg/kg) n'est plus observée chez les souris invalidées pour les récepteurs  $A_{2A}$  (El Yakoubi et al., 2000). Un effet dépressur y a même été retrouvé (Ledent et al., 1997). A l'inverse, les effets de la caféine sont faiblement modulés lors du blocage des récepteurs  $A_1$ . L'utilisation de souris fb $A_{2A}$ KO, un modèle dans lequel seuls les récepteurs  $A_{2A}$  neuronaux du striatum, cortex et hippocampe sont invalidés, a permis



d'identifier ces récepteurs comme la cible des effets moteurs de la caféine (Yu et al., 2008b). Dans le striatum, les récepteurs  $A_{2A}$  antagonisent les effets médiés par les récepteurs à la dopamine de type 2 ( $D_2$ ) par un mécanisme d'hétérodimérisation (Ferré et al., 1997). L'inhibition de la libération de GABA par les récepteurs  $D_2$  est donc prévenue par l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  ce qui va avoir pour conséquence de réduire l'activité de la voie indirecte des ganglions de la base (Striatum – Globus pallidus pars externa (GPe) – Noyau Subthalamique) et donc la motricité associée. La levée d'inhibition des récepteurs  $D_2$  par le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  explique alors les effets moteurs de la caféine, bien que partiellement (pour revue voir Fisone et al., 2004). En effet, ces effets psychomoteurs sont retrouvés chez les souris WT mais également chez les souris  $D_2R$  KO de manière plus modérée (Zahniser et al., 2000 ; Chen et al., 2001). Il a également été mis en évidence un rôle de DARPP-32, une molécule de la signalisation à la dopamine, puisque les souris DARPP-32KO ont une réponse motrice à la caféine considérablement réduite. Les effets moteurs de la caféine  $D_2R$  dépendants s'expliquent donc par l'activation de DARPP-32, notamment via la phosphorylation du résidu thréonine 75 (Lindskog et al., 2002).

## Chapitre 6 : Caféine, récepteurs adénosinergiques et maladie d'Alzheimer

La concentration plasmatique de caféine retrouvée à la suite d'une consommation habituelle est uniquement compatible avec le blocage des récepteurs adénosinergiques, principalement  $A_1$  et  $A_{2A}$  (Fredholm et al., 1999). L'inhibition centrale de ces récepteurs va alors moduler la plasticité synaptique et être à l'origine des effets psychostimulants et psychomoteurs de la caféine détaillés dans le chapitre 4. L'amélioration des performances cognitives induite par la caféine est davantage visible chez le sujet âgé que jeune chez qui ces dernières se dégradent (Jarvis, 1993). De manière concomitante, il a été observé une modification du métabolisme extracellulaire de l'adénosine au cours du vieillissement (Cunha et al., 2001), en parallèle d'une augmentation de la densité et de l'activité facilitatrice des récepteurs  $A_{2A}$  contre une réduction des récepteurs  $A_1$  (Lopes et al., 2002 ; Rebola et al., 2003). Dans ce contexte, le blocage de ces récepteurs par la caféine va avoir des conséquences différentes sur l'activité cérébrales et les performances cognitives.

### 1. Effets de la caféine sur le déclin cognitif

#### 1.1. Au cours du vieillissement normal

Au cours du vieillissement dit normal, des changements s'opèrent au sein du cerveau. Une perte de la coordination de l'activité des différentes structures cérébrales est notamment observée, ce qui se traduit par une détérioration lente et progressive des performances cognitives (Andrews-Hanna, 2007 ; Bishop et al., 2010). Dans ce contexte, une étude rétrospective réalisée chez des sujets en bonne santé et âgés de plus de 65ans a montré que la consommation chronique de caféine est associée à une amélioration des performances cognitives bien qu'observée uniquement chez les femmes (Johnson-Kozlow et al, 2002). Par ailleurs, des études longitudinales ont observé un ralentissement du déclin cognitif par la caféine chez les femmes (Richie et al., 2007) mais également chez les hommes (Van Gelder et al., 2007). Cet effet neuro-protecteur de la caféine semble dose-dépendant et maximal pour une consommation de 3 tasses de café par jour soit environ 200mg de caféine (Van Gelder et al., 2007). La différence observée entre homme et femme dans certaines études n'est pas clairement expliquée. Une variation dans la pharmacocinétique du métabolisme de la caféine (Carrillo et al., 1996 ; Relling et al., 1992) ou encore la réduction du taux d'œstrogène circulant (Ascherio et al., 2004) pourraient en être à l'origine

Le ralentissement du déclin cognitif induit par la caféine ne se limite pas au vieillissement mais est également présent dans d'autres situations pathologiques dans lesquelles se retrouve une altération des performances mnésiques. L'utilisation de modèles animaux a ainsi mis en évidence que la caféine réduit les déficits cognitifs induit par les troubles de l'attention avec hyperactivité, le stress, l'alcool, le diabète, la maladie de Parkinson ou encore la MA (pour revue Cunha et Agostinho, 2010).

### 1.2. Au cours de la maladie d'Alzheimer

La détérioration des facultés intellectuelles est un processus normal du vieillissement qui se traduit généralement par des pertes de mémoire. Ces altérations peuvent être beaucoup plus marquées et donner naissance à des troubles cognitifs sévères, on parle alors de démences dont la plus répandue est la démence de type Alzheimer. Plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées au lien existant entre la consommation chronique de caféine et l'apparition de la MA. L'étude longitudinale de Lindsay et al., 2002 a ainsi mis en évidence que les individus consommateurs de caféine réduisent le risque de développer la MA sur 5 ans de 31%, faisant de la caféine un facteur protecteur. De manière similaire, il a été montré que la consommation de 3 à 5 tasses de café par jour vers 40-50ans réduit de 65% le risque de développer la MA 21 ans plus tard (Eskelinen et al., 2009). Rétrospectivement, il a en effet été observé une corrélation inverse entre l'apparition de la MA et la consommation de caféine des 20 années précédentes. Les patients atteints de la MA consommaient en moyenne  $73,9 \pm 97,9$ mg de caféine contre  $198,7 \pm 135,7$ mg chez les sujets sains (Maia et de Mendonça, 2002). Alors qu'elle réduit l'incidence de la MA, il a été observé que la caféine ralentit la progression des altérations cognitives. L'étude longitudinale de Cao et al., 2012 a ainsi mis en évidence que la concentration plasmatique de caféine est en moyenne 51% plus faible chez les patients MCI (mild cognitive impairment) évoluant 2 à 4 ans plus tard vers un statut cognitif plus sévère qualifié de dément (MCI=>DEM) par rapport aux patients MCI conservant le même statut (MCI =>MCI). Il a en outre été montré que la moitié des patients MCI=>MCI ont une concentration plasmatique supérieure ou égale à  $6\mu\text{M}$  alors que cette dernière est systématiquement retrouvée inférieure chez les patients MCI=>DEM. La consommation chronique de caféine permet donc de retarder l'âge des premières manifestations cliniques de la MA mais également sa progression. Ces observations ont fait l'objet de revues à retrouver en annexe : Blum et al., 2012 ; Flaten, Laurent et al., sous presse.

## 2. Les récepteurs adénosinergiques comme cible thérapeutique de la MA

### 2.1. Apport de la caféine

Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence qu'une consommation chronique de caféine réduit les altérations cognitives induites par A $\beta$  aussi bien lors d'un traitement préventif que curatif. L'étude d'Arendash et al., 2006, réalisée chez des souris APPsw (un modèle murin transgénique mimant la pathologie amyloïde retrouvée dans la MA), a utilisé 1,5mg de caféine par jour ce qui représente une quantité de 500mg de caféine chez l'homme soit environ 5 tasses de café. Le traitement a débuté à l'âge de 4 mois, et s'est terminé à 9 mois. La fonction cognitive de ces animaux a été évaluée à 9mois-9,5mois par différents tests comportementaux de mémoire spatiale/de travail/de reconnaissance et ont montré que la caféine prévenait des déficits cognitifs observés chez les souris APPsw. Les problèmes comportementaux de ces souris sont dus aux formes oligomériques d'A $\beta$  et non aux dépôts amyloïdes qui ne sont pas encore formés au sein de l'hippocampe ou du cortex à cet âge. Les formes solubles A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42 ont alors été mesurées dans l'hippocampe et sont plus faibles chez les souris APPsw traitées par rapport aux souris APPsw non traitées. La réduction de BACE-1 et PS1 observée suggère une diminution de la production du peptide amyloïde par la caféine (Arendash et al., 2006). De la même manière, un traitement de 0,5 et 30mg de caféine par jour (soit 60mg chez l'homme) a été administré pendant 12 semaines à des lapins nourris avec une alimentation riche en cholestérol (CHOL) , un modèle de pathologie Tau et amyloïde (Prasanthi et al., 2010). Il a été observé une réduction de A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42 dans l'hippocampe associée à une baisse de BACE-1 et APP chez les lapins CHOL traités aux deux doses de caféine par rapport aux lapins CHOL non traités. En plus de cet effet sur la production d'A $\beta$ , la caféine pourrait augmenter la clairance du peptide comme suggéré par l'augmentation d'IDE chez les lapins CHOL traités à 0,5mg de caféine (Prasanthi et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré qu'un traitement curatif de la caféine peut reverser les altérations comportementales et histopathologiques induites par A $\beta$  et déjà établies. En effet, une consommation de caféine de 1,5mg par jour pendant 4-5 semaines chez des souris APPsw âgées de 18-19mois reverse leurs déficits cognitifs et diminue les formes solubles A $\beta$ 1-40 et A $\beta$ 1-42 dans le cortex et l'hippocampe (Arendash et al., 2009). Il a également été montré que les souris APPsw traitées à la caféine présentent une baisse de 40% et 46% respectivement dans l'hippocampe et le cortex entorhinal des dépôts amyloïdes. Enfin une réduction de BACE-1 a été observée, ce qui mettrait en jeu la voie cRaf-1/NF $\kappa$ B. En effet, la caféine restaure l'activité de la PKA qui est réduite chez les souris APPsw, ce qui diminue la

phosphorylation de cRaf en Ser338 diminue l'activité du facteur de transcription NFκB qui n'induit plus l'expression de BACE-1, ce qui contribue à réduire la charge amyloïde centrale (Arendash et al., 2009). Une réduction de l'activité et de l'expression de GSK-3 a également été observée in vitro ce qui peut moduler la production de Aβ via PS1 mais également la phosphorylation de Tau (Arendash et al., 2009 ; Prasanthi et al., 2010). Enfin, il a été montré in vivo qu'un traitement court de caféine chez des souris WT (2 semaines – 40mg/kg soit environ 2 tasses de café) pourrait stimuler l'expression de la glycoprotéine P et ainsi faciliter la clairance du peptide amyloïde (Abuznait et al., 2011 ; Qosa et al, 2012). Les quantités de caféine utilisés dans ces études sont uniquement compatibles avec le blocage des récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> (Fredholm et al., 1999), suggérant que leur blocage est à l'origine des effets de la caféine observés vis à vis de la pathologie amyloïde.

## 2.2. Effets du blocage ciblé des récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> sur la physiopathologie de la MA

### 2.2.1. Récepteurs A<sub>1</sub>

Un profil de localisation des récepteurs adénosinergiques différent au cours de la MA a été révélé, bien que leur rôle dans la régulation de la physiopathologie de la MA soit mal connu. Des études post-mortem ont mis en évidence une augmentation du nombre et de la densité des récepteurs A<sub>1</sub> et A<sub>2A</sub> (par Binding et WesternBlot) au sein du cortex préfrontal de patients atteints de la MA à un stade précoce et avancé (Albasanz et al., 2008). De plus, une redistribution de ces récepteurs a été observée dans le cortex et l'hippocampe de ces patients telle qu'une augmentation de la quantité de récepteurs A<sub>1</sub>, observée dans les neurones où une accumulation anormale de protéine Tau est visible ou encore au sein de neurites dystrophiques présents dans les plaques séniles. Une augmentation de l'expression microgliale du récepteur A<sub>2A</sub> est également observée au sein de l'hippocampe (Angulo et al., 2003). L'expression transcriptionnelle de ces récepteurs reste quant à elle inchangée. Il a par ailleurs été montré dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (SH-SY5Y), que l'activation des récepteurs A<sub>1</sub> promeut la phosphorylation de Tau à travers la signalisation p21Ras/Erk (Angulo et al., 2003). Le blocage de ces récepteurs par la caféine peut alors réduire la phosphorylation de tau et moduler la pathologie tau retrouvée dans la MA. Il faut toutefois prendre en considération les effets inverses obtenus à la suite d'un blocage aigu vs chronique de ces récepteurs. En effet, une augmentation de l'expression et de l'activité des récepteurs A<sub>1</sub> est observée dans le second cas. C'est pourquoi le blocage aigu des récepteurs A<sub>1</sub> est délétère au cours d'ischémie ou de traumatismes cérébraux, deux pathologies dans lesquelles est observée un phénomène d'excitotoxicité, mais s'avère neuroprotecteur en

situation chronique en raison de leur effet dépressur sur l'activité neuronale (Jacobson et al., 1996 ; Li et al., 2008). Malgré ces effets intéressants, les récepteurs A<sub>1</sub> ne sont pas une bonne cible thérapeutique. En effet, alors que l'utilisation d'agonistes conduit à une désensibilisation rapide de ces récepteurs A<sub>1</sub> (Coelho et al., 2006 ; León et al., 2009), les antagonistes sont associés à des effets périphériques délétères et notamment une élévation de la pression artérielle (Brown et al., 2006 ; Russell et al., 2006).

### 2.2.2. Récepteurs A<sub>2A</sub>

#### 2.2.2.1. Mécanismes neuronaux

La caféine peut également exercer ses effets par le blocage des récepteurs A<sub>2A</sub>. Il a en effet été observé que le blocage spécifique des récepteurs A<sub>2A</sub>, et non A<sub>1</sub>, reproduit les effets observés par la caféine (1-25µM) sur la réduction de la neurotoxicité induite par Aβ dans une culture primaire de cellules granulaires du cervelet (Dall'Igna et al., 2003). Ces effets ont été confirmés in vivo où l'administration sub-chronique de caféine (30mg/kg - 1 fois par jour pendant 4jours) et d'un antagoniste A<sub>2A</sub>, réduisent tout deux les déficits cognitifs induits par l'injection icv d'Aβ (Dall'Igna et al., 2007). L'étude de Canas et al., 2009 révèle également que le blocage des récepteurs A<sub>2A</sub>, tant pharmacologique que génétique, prévient des altérations cognitives induites par l'injection aigüe d'Aβ. De plus il a démontré que leur inhibition prévient de la perte de l'intégrité synaptique (baisse de la synaptophysine, SNAP-25) médiée par Aβ par un mécanisme p38 MAPK dépendant. L'injection de scopolamine ou de MK-801, respectivement un inhibiteur des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et un antagonisme des récepteurs NMDA, peut rapidement (en à peine 30 minutes) induire des troubles cognitifs sévères. Alors que le SCH58261 et le KW6002, deux inhibiteurs spécifiques des récepteurs A<sub>2A</sub>, contrecarrent tout deux les altérations mnésiques observées 15 jours après l'injection icv d'Aβ, il n'a été mesuré aucun effet de ces antagonistes sur le déficit mnésique induit par l'injection aigüe de scopolamine ou de MK801 (Cunha et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les dysfonctionnements mnésiques observés font intervenir des processus différents. En effet, il est intéressant de remarquer que le blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> peut contrer la synaptotoxicité médiée par Aβ à l'origine de la dégénérescence neuronale qui conduira de manière lente et progressive à l'apparition de dysfonctionnements mnésiques. A l'inverse, l'absence d'effet observé suite à l'injection aigüe de MK801 et de scopolamine suggère que ces récepteurs n'affectent pas directement les bases pharmacologiques de la mémoire. (Cunha et al., 2008), ce qui est en accord avec les effets de la caféine sur la

mémoire en absence vs présence d'altérations mnésiques (Cunha et Agustino, 2010 ; Nehlig, 2010). Toutefois il a été montré que le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  peut améliorer la mémoire de travail ou encore la mémoire spatiale des souris (Wang et al., 2006 ; Zhou et al., 2009). De la même manière, des effets délétères sur la mémoire de travail ont été retrouvés dans un modèle de rat transgénique qui surexprime le récepteur  $A_{2A}$  spécifiquement dans le cerveau (Giménez-Llort et al., 2007). Le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  peut donc réduire les déficits mnésiques autrement que par une baisse de la synaptotoxicité induite par  $A\beta$ .

#### 2.2.2.2. Mécanismes non neuronaux

Les récepteurs  $A_{2A}$  ont une localisation neuronale mais également gliale puisqu'ils sont retrouvés au sein des astrocytes et des cellules microgliales. Les récepteurs  $A_{2A}$  gliaux participent donc aux effets bénéfiques détaillés précédemment. Il a en effet été observé que le blocage pharmacologique des récepteurs  $A_{2A}$  contrecarre la réduction de la recapture astrogliale de glutamate induite par  $A\beta$  en normalisant l'expression de GLT-1 et GLAST au sein des astrocytes ce qui prévient des phénomènes d'excitotoxicité au glutamate et donc de la mort neuronale (Matos et al., 2012). Les récepteurs  $A_{2A}$  gliaux participent par ailleurs au contrôle de la neuro-inflammation. Il a ainsi été mis en évidence que l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  stimule la motilité et l'activité des cellules microgliales (Orr et al., 2009), en augmentant la libération de NO ou encore de PGE2 (Saura et al., 2005 ; Fiebich et al., 1996). Par ailleurs, ils stimulent la prolifération et l'activité des astrocytes (Hindley et al., 1994). Une inflammation cérébrale exerce des effets délétères sur la plasticité synaptique et favorise les dysfonctionnements mnésiques (Yirmiya et al., 2002 ; Sparkman et al., 2005). La libération d'IL-1 $\beta$ , un marqueur précoce de l'inflammation, peut ainsi altérer la LTP hippocampique en augmentant l'activité de p38 MAPK (Tong et al., 2012). La réduction de l'activité microgliale induite par la minocycline permet quant à elle de restaurer une LTP dans la CA1 chez le rat âgé (Liu et al., 2012). Les effets neuroprotecteurs observés à la suite du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  peuvent donc s'expliquer par une réduction des effets négatifs induits par la neuro-inflammation. Il a été montré in vitro que le SCH58261, un antagoniste des récepteurs  $A_{2A}$  prévient l'exacerbation de la neurotoxicité au glutamate induite par IL-1 $\beta$  en réduisant la phosphorylation de p38 MAPK et JNK (Simões et al., 2012). De la même manière, le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  prévient l'augmentation de IL-1 $\beta$  induit par le LPS, et donc l'augmentation de p38 MAPK, JNK et caspase 3. Il en résulte une atténuation des altérations de la LTP hippocampique chez les rats traités au LPS + SCH58261 par rapport aux rats traités

au LPS seul (Rebola et al., 2011). Il a été montré de manière intéressante que les effets pro-inflammatoires liés à l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  sont sous la dépendance des niveaux de glutamate présents dans le milieu extracellulaire. En effet, en présence de faibles concentrations de glutamate (100 $\mu$ M), l'utilisation de CGS21680, un agoniste des récepteurs  $A_{2A}$ , réduit l'induction de iNOS par le LPS in vitro en augmentant la PKA. A l'inverse, pour des concentrations de glutamate supérieures à 500 $\mu$ M, l'activation des récepteur  $A_{2A}$  devient pro-inflammatoire et fait intervenir la PKC (Dai et al., 2010). Ces résultats permettent de comprendre les effets neuroprotecteurs observés à la suite du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  dans des situations où une excitotoxicité au glutamate est présente. Par ailleurs, ils fournissent une explication à la dichotomie retrouvée dans les effets des récepteurs  $A_{2A}$  et de leur modulation dans des situations pathologiques affectant les organes périphériques vs le cerveau (pour revue : Haskó et Pacher, 2008). Il ne faut enfin pas sous-estimer le rôle des récepteurs  $A_{2A}$  périphériques, et notamment ceux localisés au sein des cellules leucocytaires (lymphocytes, monocytes, neutrophiles), dans la modulation de pathologies centrales (Yu et al., 2004).

### 2.3. Modulation de la pathologie Tau

Bien qu'il ait été démontré des effets bénéfiques de la caféine et du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  vis à vis du versant amyloïde de la MA, très peu d'études se sont intéressées aux conséquences de la modulation des récepteurs adénosinergiques sur la pathologie tau. Jusqu'à présent, les quelques études disponibles se sont focalisées sur les effets de la caféine. Il a en effet été observé que son utilisation peut contrebalancer la mort neuronale induite par l'expression de protéines tau mutées dans un modèle de culture primaire de neurones hippocampiques (Stoppelkamp et al., 2011). Par ailleurs, elle réduit in vitro la phosphorylation de la protéine tau sur certains épitopes, en modulant la voie de signalisation akt dans des neurones corticaux de rat. (Currais et al., 2011). Cette dernière étude a néanmoins utilisé des concentrations bien plus élevées que celles retrouvées à la suite d'une consommation habituelle de caféine (>10mM) (Fredholm et al., 1999), ce qui interpelle sur la pertinence physiologique de ces résultats. Enfin il a été observé qu'un traitement de 12 semaines de caféine à une concentration de 30 mg/jour module l'hyperphosphorylation de la protéine tau induit par le régime riche en cholestérol chez le lapin (Prasanthi et al., 2010). Les effets de la caféine sur la pathologie Tau peuvent impliquer une réduction de l'activité de la GSK3 mais globalement, les mécanismes sous jacents sont peu connus. De plus, la littérature existante est insuffisante pour estimer le potentiel des récepteurs adénosinergiques comme cible thérapeutique vis à vis de la pathologie tau. Il a uniquement été observé jusqu'à présent



que l'activation des récepteurs  $A_1$  dans la lignée SY5Y augmente la phosphorylation de tau par un mécanisme faisant intervenir la voie p21Ras/Erk, suggérant un effet bénéfique de la caféine sur la pathologie tau par le blocage de ces récepteurs. Les liens entre le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  et la pathologie tau demeurent actuellement inconnus. Pourtant, l'utilisation d'antagoniste d' $A_{2A}$  est une approche intéressante cliniquement de par l'absence d'effets secondaires délétères retrouvés chez l'homme. De plus, certains tel que l'istradefylline (KW-6002) font actuellement l'objet d'essai clinique notamment dans la maladie de Parkinson (Chen et al., 2013). L'objectif de mon travail de thèse a alors consisté à déterminer les effets du blocage de ces récepteurs dans un modèle de pathologie tau.

# Objectifs



## Objectifs du travail de thèse

**Un des objectifs de ce travail de thèse consiste à caractériser les différents aspects de la réponse neuro-inflammatoire dans un modèle de pathologie tau.**

La MA est une maladie neurodégénérative incurable qui se traduit par une atteinte progressive des fonctions cognitives, en premier lieu les fonctions mnésiques. Elle se traduit d'un point de vue histopathologique par la présence conjointe de deux lésions caractéristiques que sont la pathologie amyloïde et la DNF, mais également d'une perte neuronale et synaptique ainsi que d'une réponse neuro-inflammatoire. Les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à l'apparition et la progression de la maladie ne sont actuellement pas totalement élucidés. Afin de mieux appréhender ces différents processus, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire. Même s'ils ne reproduisent que partiellement les caractéristiques de la MA et qu'ils se focalisent uniquement sur certains aspects, ils permettent d'identifier différents mécanismes pathologiques.

Plusieurs modèles de pathologie tau ont été créés. Les premiers d'entre eux surexpriment une isoforme 3R ou 4R de la protéine tau humaine non mutée et reproduisent en partie certaines caractéristiques retrouvées dans la MA telle que l'hyperphosphorylation de tau et sa relocalisation somato-dendritique (Götz et al., 1995 ; Brion et al., 1999). Une réduction de la solubilité de tau est également observée au cours du vieillissement mais conduit à la formation d'agrégats uniquement à un âge très tardif. Par ailleurs une hyperphosphorylation de tau observée au sein de la moelle épinière est indicateur de la présence de problèmes moteurs (Spittaels et al., 1999 ; Ishihara et al., 2001). De manière séduisante a été générée la lignée htau par transfert d'un mini-gène de tau humain. Ces souris expriment les 6 isoformes de la protéine et sont invalidées pour la protéine tau murine. Elles présentent une accumulation somato-dendritique de protéines tau phosphorylées, des PHF, une distribution spatio-temporelle de la pathologie tau comparable à ce qui est observée dans la MA ainsi que des troubles cognitifs et des altérations synaptiques de façon dépendante de l'âge (Andorfer et al., 2003 ; Polydoro et al., 2009). Ce modèle de tauopathie est intéressant dans l'étude de l'épissage de tau mais possède l'inconvénient d'être relativement instable (McMillan et al., 2008). D'autres modèles de pathologie tau tels que les lignées PS19, JNPL3, rTg4510,

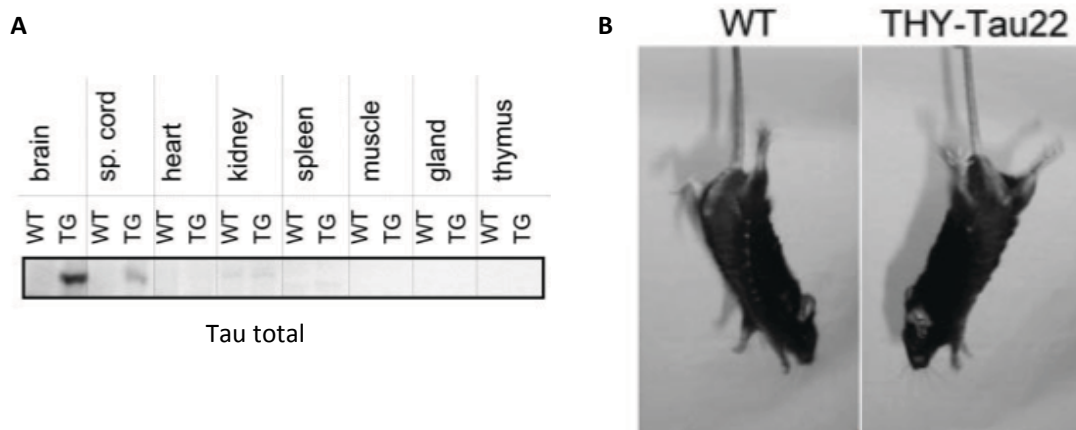
Tau<sub>RD</sub>/ΔK280 et THY-Tau22, se sont quant à eux basés sur l'existence de mutations du gène tau dans les FTDP-17. Les souris de la lignée PS19 expriment le gène codant pour la protéine tau humaine mutée sur le site P301S. Il s'agit d'un modèle agressif de pathologie tau qui présente précocement (avant 6mois) et de façon dépendante de l'âge une hyperphosphorylation de tau, une réduction de sa solubilité ainsi qu'une mort neuronale. La pathologie tau est présente dans la moelle épinière ce qui conduit à l'apparition progressive de troubles moteurs entraînant une paralysie puis la mort de l'animal vers 9-12mois (Yoshiyama et al., 2007). De la même manière, les souris de la lignée JNPL3 générées par l'expression de la protéine tau humaine mutée sur le site P301L, présentent une pathologie tau cérébrale et médullaire à l'origine de troubles comportementaux et moteurs de façon dépendante de l'âge, en parallèle d'une mort neuronale. Ces modèles permettent d'étudier les différents processus cellulaires et moléculaires à l'origine de la dégénérescence neuronale induite par tau (Lewis et al., 2000). Les modèles rTg4510 et Tau<sub>RD</sub>/ΔK280 sont des modèles de pathologie tau inductibles qui possèdent respectivement les mutations P301L et ΔK280. Chez les souris rTg4510, l'hyperphosphorylation de tau et sa nucléation sont des phénomènes très précoces (2,5-4mois) qui coïncident avec l'apparition de troubles comportementaux et précèdent la mort neuronale (à partir de 5,5mois). Ce modèle et les souris ΔK280 permettent de mesurer les effets pro-toxiques des formes agrégées de tau sur la mort neuronale et les troubles comportementaux (SantaCruz et al., 2005 ; Mocanu et al., 2008). La présence d'une dégénérescence neuronale relativement précoce dans ces modèles ne permet toutefois pas d'appréhender les effets directs de la pathologie tau sur les altérations synaptiques, comportementales et sur la réponse neuro-inflammatoire.

Au sein du laboratoire, nous disposons de la lignée THY-Tau22. Ces souris surexpriment à l'état hétérozygote l'isoforme 1N4R du gène *mapt* muté sur les sites P301S et G272V, sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2 (Figure 23).



**Figure 23** Construction du transgène. L'isoforme 1N4R du gène tau humain, codant pour 412 acides aminés, présente les deux mutations G272V et P301S dans l'exon 10, au niveau d'une région permettant la fixation de la protéine aux microtubules. Le transgène est sous le contrôle du promoteur neuronal Thy1.2 (Schindowski et al., 2006).

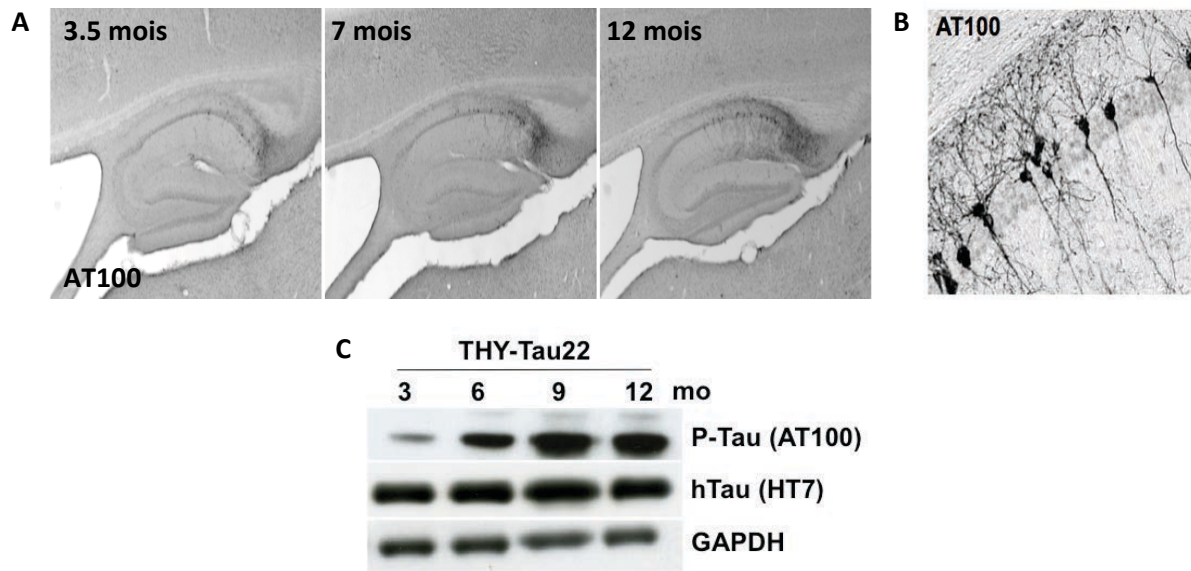
Dix copies de transcrits sont présentes dans le cerveau de ces animaux alors que l'expression du transgène est résiduelle dans la moelle épinière et inexistante dans les organes périphériques (Figure 24). De plus, la pathologie tau affecte très modérément les structures cérébrales impliquées dans la locomotion comme le striatum, ce qui permet d'obtenir un modèle exempt de trouble moteur (Schindowski et al., 2006).



**Figure 24** Phénotype moteur des souris THY-TAU22. L'expression par western-blot de la protéine tau totale révèle une expression principalement cérébrale. Une expression à l'état de trace se retrouve dans la moelle épinière mais qui n'a aucune incidence sur la locomotion des animaux (A). En effet, le test de la queue suspendue met en évidence un réflexe de préhension comparable entre animaux WT et THY-Tau22 à 10mois (B). L'absence d'altération motrice chez ces animaux permettra de réaliser sans aucune perturbation les différents tests comportementaux nécessaires à la caractérisation du modèle (Schindowski et al., 2006).

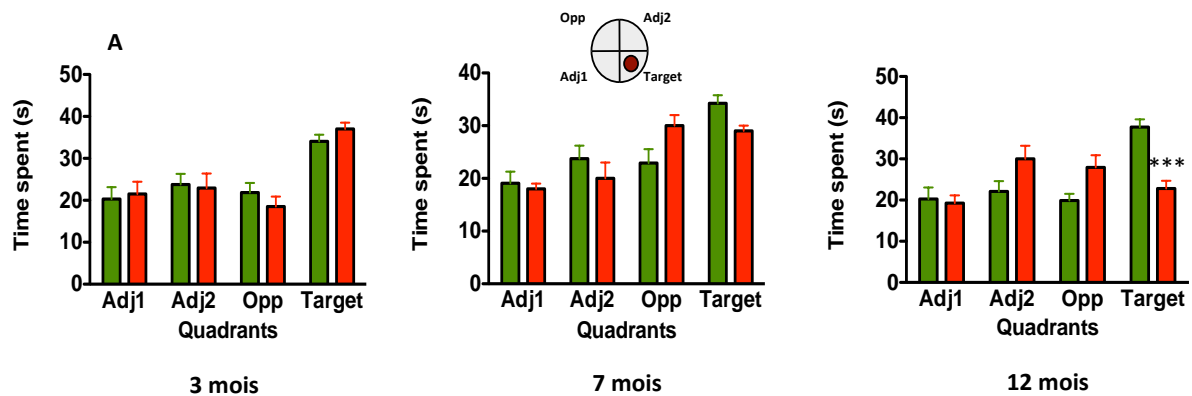
Le modèle THY-Tau22 développe une pathologie tau qui prend naissance dans le subiculum et la région CA1 de l'hippocampe dès l'âge de 3mois, puis s'étend progressivement dans la CA3, le gyrus denté et le cortex en suivant une distribution spatio-temporelle fidèle à ce qu'il s'observe durant le stade prodromal de la MA. Les études biochimiques d'extraits hippocampiques de ces animaux permettent de mettre en évidence une hyperphosphorylation de la protéine tau sur certains épitopes (Ser396, Ser404, Thr231/Ser235, Ser202/Thr205) ainsi qu'une phosphorylation anormale sur les épitopes Thr212/Ser214 (AT100) et Ser422 de façon dépendante de l'âge, ce qui reflète la progression de la pathologie tau. Par ailleurs l'immuno-réactivité de l'anticorps conformationnel AT100 sur des coupes d'hippocampe permet de

mesurer d'une part le nombre de neurones AT100-positifs au cours du temps et donc la progression de la pathologie, mais révèle également de manière tout à fait intéressante une relocalisation somato-dendritique de la protéine tau (Figure 25), caractéristique retrouvée dans le cerveau des patients atteints de la MA.



**Figure 25** Pathologie tau hippocampique des souris THY-Tau22. A. L'immuno-réactivité de l'anticorps AT100 sur les coupes d'hippocampe met en évidence une progression de la pathologie tau au sein de la CA1 au cours du vieillissement (A). Ce marquage AT100 a une localisation principalement somato-dendritique (B). Les études biochimiques révèlent une phosphorylation anormale de la protéine tau de plus en plus intense, sans modification majeure de l'expression protéique du transgène, révélée ici par l'anticorps HT7. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

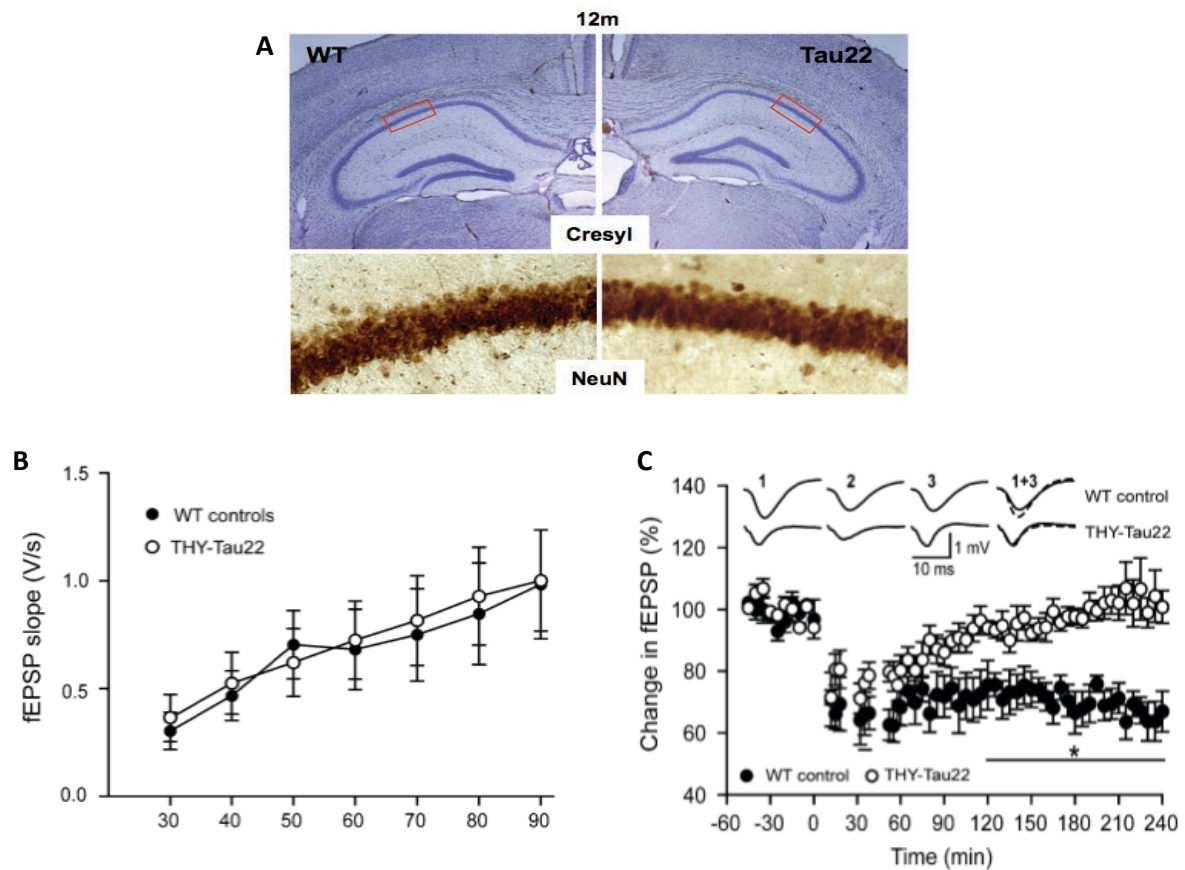
Parallèlement à cette pathologie tau hippocampique, les souris THY-Tau22 développent des altérations progressives de leur mémoire spatiale, comme observé par le test de la piscine de Morris (Schindowski et al., 2006 ; Van der Jeugd et al., 2013a ; et Burnouf et al., 2013 Cf annexe). Dans ce paradigme expérimental, des déficits de restitutions mnésiques sont en effet observés à un âge de 12 mois (Figure 26). De la même manière, le test du Y-maze a confirmé l'existence de troubles cognitifs à cet âge (Belarbi et al., 2011 Cf annexe). Par ailleurs, à ces altérations cognitives s'ajoutent des perturbations comportementales et psychologiques telle qu'une augmentation de l'activité et de l'agressivité. Des signes de dépressions ont également été mis en évidence (Van der Jeugd et al., 2013b).



**Figure 26** Altération de la mémoire spatiale des souris THY-Tau22 observée par le test de la piscine de Morris. La phase de restitution mnésique se déroule 72h après le dernier jour d'apprentissage. La plate forme est ici retirée et le temps passé par les souris dans le quadrant où elle y figurait (Target) vs les 3 autres quadrants est mesuré. L'atteinte mnésique des souris est alors inversement corrélée au temps passé dans le quadrant cible. Une atteinte significative est observée à 12mois chez les souris THY-Tau22.

Le modèle THY-Tau22 ne présente aucun signe de mort neuronale avant l'âge de 12mois. En effet, l'utilisation du crésyl-violet et de l'anticorps NeuN ne révèle aucune différence dans l'épaisseur de la couche pyramidale de la CA1 entre les animaux contrôles et transgéniques (Figure 27a). Ces résultats indiquent alors que les altérations comportementales sont imputables à la seule pathologie tau et en aucun cas aux conséquences d'une mort neuronale. De la même manière, aucune réduction de l'intégrité synaptique n'est observée dans ce modèle comme le démontre l'absence de changement d'expression protéique des marqueurs synaptiques syntaxine-1, spinophiline et PSD-95 (Van der Jeugd et al., 2011 ; Burnouf et al., 2013). Il en résulte alors une activité synaptique de base non altérée chez ces animaux comme mesurée au cours des études d'électrophysiologie « d'input/output » (Figure 27b). Il a toutefois été observé à partir de 10 mois, une réduction du maintien de la LTD chez les souris THY-Tau22 (Figure 27c).





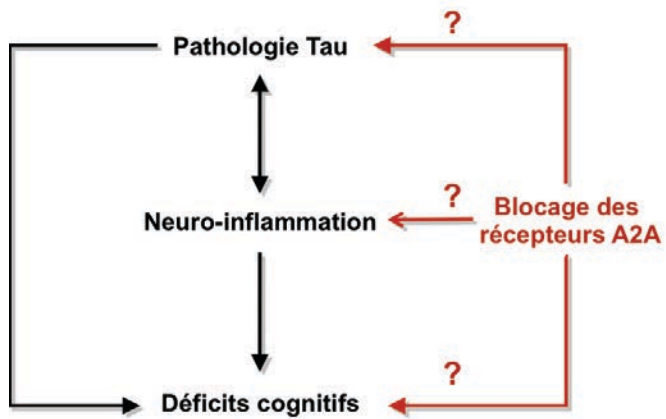
**Figure 27** Absence de mort neuronale et altération électrophysiologique mineure dans le modèle THY-Tau22. Les études immuno-histochimiques réalisées par le crésyl-violet et le marquage anti-NeuN ne révèlent aucun signe d'atrophie de la couche pyramidale CA1 de l'hippocampe à cet âge (A). Le protocole d'électrophysiologie input/output ne montre aucune différence dans l'activité synaptique de base chez les animaux transgéniques à 10 mois. À l'inverse, il a été observé que la LTD, même si son amplitude est comparable entre les deux génotypes, n'est pas maintenue chez les souris THY-Tau22 avec un effet significatif à partir de 2 heures (C) (Van der Jeugd et al., 2011).

Le développement d'une pathologie tau hippocampique associée à des déficits mnésiques sans aucune mort neuronale majeure avant l'âge de 12 mois, fait de la lignée THY-Tau22 un excellent modèle dans lequel étudier les différents processus neuro-inflammatoires spécifiquement imputables à Tau. En effet, les seules études réalisées dans des modèles de tauopathie qui ont observé une réponse neuro-inflammatoire ont soit eu lieu en présence d'une dégénérescence neuronale ou se sont uniquement centrées sur la réponse astro/microgiale (Bellucci et al., 2004 ; Yoshiyama et al., 2007). Les études transcriptionnelles, biochimiques et immuno-histochimiques présentées dans la première partie de mes résultats visent donc à caractériser la réponse neuro-inflammatoire du modèle

THY-Tau22 vis à vis de l'astrogliose et la microgliose réactionnelle mais également de manière tout à fait intéressante la réponse cytokinique et l'immunité adaptative.

La MA est une maladie multifactorielle dont la survenue résulte de la conjonction de différents facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ces derniers, la consommation chronique de caféine apparaît comme un facteur protecteur qui réduit le risque de survenue de la maladie mais également sa progression (Maia et de Mendonça, 2002 ; Eskelinen et al., 2009 ; Cao et al., 2012). Par ailleurs, l'analyse post-mortem de cerveaux appartenants à des patients souffrants de la MA, mais également les résultats des études pan-génomiques révélant des gènes tels que CR1, CD33 ou TREM surexprimés chez ces patients (Kamboh et al., 2012 ; Cruchaga et al., 2013), attestent que la neuro-inflammation est une caractéristique importante de la MA et contribue à son développement (voir chapitre 3 de l'introduction). En outre, le blocage des récepteurs  $A_{2A}$ , par la caféine ou par un antagoniste spécifique réduit cette réponse neuro-inflammatoire dans différentes conditions neuropathologiques (Brothers et al., 2010 ; Dai et al., 2010 ; Rebola et al., 2011). Dans la mesure où cette dernière est associée à la présence de troubles cognitifs et augmente la pathologie tau, il sera intéressant de voir dans quelles mesures le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  influe sur ces différents paramètres dans notre modèle THY-Tau22 (Figure 28). Cette étude est d'autant plus innovante que les effets de la caféine ou du blocage spécifique des récepteurs  $A_{2A}$  sur la pathologie tau n'ont jamais été investigués.

**Le second objectif de ce travail de thèse consiste donc à évaluer l'impact de la caféine et du blocage génétique des récepteurs  $A_{2A}$  sur les altérations comportementales, la pathologie tau et la réponse neuro-inflammatoire des souris THY-Tau22.**



*Figure 28 Représentation schématique des conséquences directes ou indirectes du blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> sur les altérations cognitives, la pathologie tau et la réponse neuro-inflammatoire dans le modèle THY-Tau22.*

# Résultats



# Caractérisation de la réponse neuro- inflammatoire des souris THY-Tau22



# Caractérisation de la réponse neuro-inflammatoire des souris THY-Tau22

## Objectifs

La neuro-inflammation, bien que non spécifique de la MA, est un processus mis en place dans le cerveau des patients en parallèle des deux lésions histopathologiques caractéristiques que sont la DNF (ou pathologie tau) et la pathologie amyloïde. Les relations existantes entre cette dernière lésion et la réponse neuro-inflammatoire ont fait l'objet de profondes investigations et se révèlent particulièrement complexes. En effet, l'activation microgliale et astrogliale par A $\beta$ , de même que l'infiltration lymphocytaire, semblent participer à la clairance d'A $\beta$  et des dépôts amyloïdes (Fisher et al., 2010 ; Fu et al., 2012). Toutefois, la libération de cytokines pro-inflammatoires résultante de cette activation, influe sur le potentiel de phagocytose (Koenigsknecht-Talboo et Landreth, 2005 ; Pan et al., 2011) et réduit l'intégrité synaptique et neuronale, conduisant alors à une élévation de la charge amyloïde et des troubles mnésiques (Fang et al., 2010 ; Simões et al., 2012 ; Kohman et al., 2013). Il a par ailleurs été observé in vivo et in vitro que ces médiateurs de l'inflammation, et notamment l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , participent à l'hyperphosphorylation et/ou à l'agrégation de la protéine tau (Sheng et al., 2000 ; Gorlovoy et al., 2009 ; Bhaskar et al., 2010), suggérant alors un rôle délétère de la neuro-inflammation sur la pathologie tau. En ce qui concerne la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire en présence de la seule pathologie tau, très peu d'études existent. A ce jour, les seules études expérimentales réalisées se sont uniquement centrées sur l'activation microgliale et astrogliale dans des modèles de tauopathie présentant une mort neuronale précoce (Bellucci et al., 2004, Yoshiyama et al., 2007) biaisant alors les effets propres à la pathologie tau sur la neuro-inflammation par le relargage de substances antigéniques au cours de la dégénérescence neuronale. En ce sens, les souris THY-Tau22 sont un excellent modèle de tauopathie dans lequel caractériser les différents aspects de la réponse neuro-inflammatoire. Une astrogliose et une activation microgliale ont déjà été mis en évidence dans ce modèle (Schindowski et al., 2006 et Belarbi et al., 2011 Cf annexe). **L'objectif de ce travail de thèse fut donc d'approfondir et d'étendre cette caractérisation de la réponse immunitaire innée mais également d'investiguer la réponse adaptative en étudiant plus particulièrement la réponse chémokinique et l'infiltration lymphocytaire.** Ces travaux feront l'objet d'une publication prochainement.



## **Matériel et Méthode**

Des procédures expérimentales communes à la partie suivante (stabulation des animaux, analyses biochimiques et analyses transcriptionnelles) seront détaillées dans l'article Laurent et al., (soumis). Pour ces raisons, seules les expérimentations spécifiques à cette partie feront l'objet d'une description complète.

### **Transcriptomique**

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés via le kit RNeasy Lipid Tissue mini Kit (Quiagen). La qualité des ARN a été déterminée par le RNA 6000 Nano chips et le Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Les échantillons utilisés pour la puce possèdent tous un coefficient d'intégrité supérieur à 8,3. Agilent's quick Amp labelling kit (one color) a été utilisé pour générer des ARNc fluorescents. Les ARNc tagués par la cyanine-3 et amplifiés ont ensuite été purifiés sur des colonnes (RNeasy mini spin, Quiagen), et hybridés sur l'intégralité du génome murin placé sur une micromatrice 4x44K. Les coupes sont ensuite rincées et scannées par l'Agilent scanner G2505C selon les informations du fournisseur. La conversion de ces images est alors permise par l'utilisation du logiciel Agilent FeatureExtraction v.10.5.1.1. Les analyses ont ensuite été réalisées par GeneSpring 10.0 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Le test t de Student suivi d'une correction de Benjamin-Hochberg (incrémenté dans le logiciel GeneSpring 10.0) a été utilisé pour réaliser les analyses statistiques. Un fold change de 2 a été appliqué (modulation de l'expression d'au moins 100% par rapport à la condition contrôle) permettant de révéler 32 gènes différemment exprimés.

### **Analyse Immunohistochimiques**

Les coupes sagittales sériées flottantes (40µm) ont été obtenues en utilisant un cryostat (Leica Microsystems GmbH). L'immunohistochimie a été réalisée sur des séries de coupes en utilisant les anticorps primaires anti-CD8 (lymphocytes T CD8<sup>+</sup> 1:100, Serotec), anti-Mac-1/CD11b (microglie 1:500, Serotec), anti-GFAP (astrocytes 1:4000, Dako), anti-pSer422 de Tau (AP422 1:2000, Biosource). Un anticorps secondaire couplé à une peroxydase a ensuite été appliqué. La révélation s'est effectuée au moyen d'un kit ABC (Vector Laboratories) avec la 3,3-diaminobenzidine (DAB) comme substrat de la peroxydase. Une fois montée sur lames, des photographies des coupes ont été effectuées à l'aide d'un microscope photonique Leica.

## **Immunofluorescence**

Les coupes sagittales s riees flottantes (40µm) ont été obtenues en utilisant un cryostat (Leica Microsystems GmbH). L'immunofluorescence a été réalisée sur des séries de coupes en utilisant les anticorps primaires suivants : ZO-1 (1:500, Zymed), occludine (1:500, Zymed), Ccl3 (1:100 R&D system), Iba-1 et IgG et les anticorps secondaires couplés aux Alexa 488 ou 568 (Invitrogen). Les sections ont été marquées et montées par le kit Vectashield/DAPI (Vector). Les images ont été prises par un microscope apotome (Imager Z1, Zeiss).

## **Cytométrie de Flux**

Les études de cytométrie de flux ont été réalisées à partir de 30µL de sang total, lequel a été prélevé à la veine caudale grâce à des tubes microvettes (Sarstedt, N mbrecht, Germany). Les immunoglobulines endogènes ont alors été bloquées par du Fc-Block (CD16/CD32 1µg, BD Pharmingen). Après 5 minutes d'incubation, les anticorps suivants, couplés à des fluorochromes, ont été appliqués : CD45-PE (30-F11, 1µg, BD Pharmingen), CD19-FITC (1D3, 1µg, BD Pharmingen), CD3e-PCy5 (145-2C11, 1µg, BD Pharmingen), CD62L-FITC (MEL-14, 1µg, BD Pharmingen) CD44-PE (IM7, 1µg, BD Pharmingen), IgG<sub>2b,k</sub>-PE (A95-1, 1µg, BD-Pharmingen), IgG<sub>1,k</sub>-PCy5 (A19-3, 1µg, BD Pharmingen) et IgG<sub>2a,k</sub>-FITC (R35-95, 1µg, BD-Pharmingen). Une incubation de 30 minutes, à l'obscurité et à température ambiante a été réalisée. Les échantillons ont ensuite été lysés (Lysing Buffer BD PharmLyse) pendant 10 minutes puis centrifugés à 500g pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant les hématies lysés est éliminé. Le culot est quant à lui homogénéisé dans du PBS 1x et transféré dans des tubes Trucount BD Pharmingen, permettant de fait la numération absolue de manière indirecte des différentes populations leucocytaires, via les billes fluorescentes contenues. Le comptage cellulaire est réalisé par l'analyseur Cyan ADP, Beckman Coulter. L'analyse des résultats a quant à elle était effectuée par le logiciel Kaluza.

## **ELISA**

Un volume équivalent de Tris Sucrose 10mM, triton 1%, NaCl 200mM est ajouté à l'homogénat total de protéines, le tout étant centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4 C. La quantité de protéine totale des surnageants est alors dos e (BCA assay, Pierce). La concentration des chémokines CCL3, CCL4 et CCL5 est quant à elle déterminée par les kit ELISA (respectivement Quantikine MMA00, M1000, MMR00) selon les informations du fournisseur et mesurée par Luminex.

## Analyses transcriptionnelles

Nom	Access number	Primer sens	Primer anti-sens	Taille de l'amplicon
CD68	NM_009853.1	gacctacatcagagcccaggt	cgccatgaatgtccactg	95
CD45	NM_001111316.2	gagggtctgatggtgcaag	tgattccactaaagcctgatgaa	69
GFAP	NM_001131020.1	cgcgaaacaggaagagcgcca	gtggcgggccatctcctct	104
TLR2	NM_011905.3	ggggctcactctctgctt	agcatcctctgcgatttgacg	110
CCL3	NM_011337.2	tgccctgctgttctctct	gtggaatctccggctgtag	112
CCL4	NM_013652.2	gccctctctcctcttctgct	gagggtcagagcccattg	72
CCL5	NM_013653.3	ctcactgcagccgcccctg	ccgagccatattggtgaggcagg	51
TNF $\alpha$	NM_013693.2	tgctatgtctcagcctctc	gaggccattgggaacttct	116
cyclophiline	NM_008907.1	agcatacaggtcctggcatc	ttcacctcccaagaccac	126
Clec7a	NM_020008.2	atggttctgggaggatggat	gcttctctgggagctgtat	72
Itgax	NM_021334.2	atggagcctcaagacaggac	ggatctgggatgctgaaatc	62
CD74	NM_010545.3	gccctagagagccagaaagg	tggtacaggaagtaagcagtgg	108
CXCL5	NM_009141.2	cctgggtccggatctgt	catgaatggcgagatggaa	81
CD3	NM_007648.4	aacacgtactgtacctgaaagctc	gatgattatggctactgctgca	77
C3	NM_009778.2	acctacctcggcaagttct	ttgtagagctgctggcagg	84
CD52	NM_013706.2	tcattctctggttgattcag	cccactcttaagggggtt	115
Slamf9	NM_029612.4	catcacgaagtcttaccatctcc	cacagtgatgtgggctt	79
ZO-1	NM_009386.2	ccacatacattccaagggcg	ggtggtctgaaagttgctgg	122
Occludine	NM_008756	tccgtgaggcctttgaa	ggtgcataatgattgggtttg	73
LFA1	NM_001253874.1	cccagactttgctactgg	cggtgtccagggttagctc	65
VCAM	NM_011693.3	tcttacctgtcgctgtgac	actggatctcaggaatgagt	85
ICAM1	NM_010493.2	cccagctacctctgctc	gatggatacctgagcatcacc	71
H2AB1	NM_207105.3	gtggtgctgatggtgctg	ccatgaactggtacacgaaatg	75
IL1 $\beta$	NM_008361.3	tgtaatgaaagacggcacacc	tctctttgggtattgctgg	67
Nrf2	NM_010902.3	catgatggactggagttgc	cctccaaaggatgtcaatcaa	75
MnSOD	NM_013671.3	tgacaaacctgagccctaa	gacccaaagtcacgcttgata	76

## Résultats

### 1. L'étude transcriptomique révèle une surexpression hippocampique de marqueurs pro-inflammatoires chez les souris THY-Tau22 à 12mois

La mise en évidence d'une réponse neuro-inflammatoire dans le modèle de tauopathie THY-Tau22 s'est tout d'abord effectuée par une approche transcriptomique à l'aide d'une micromatrice d'ADN, ceci afin d'avoir une vision globale des processus mis en jeu. Les souris THY-Tau22 développent des troubles cognitifs en parallèle d'une pathologie tau hippocampique progressive, qui s'avère être maximale à 12 mois et qui s'établit en l'absence de mort neuronale (Burnouf et al., 2013 ; Van der Jeugd et al., 2013a). La réponse neuro-inflammatoire induite par cette pathologie tau et les modifications transcriptionnelles qui l'accompagnent ont alors une plus grande probabilité d'être perçues à cet âge avancé de 12mois. L'étude transcriptomique a donc été effectuée chez des animaux transgéniques et wt âgés de 12 mois au sein de l'hippocampe, siège de la pathologie tau.

L'analyse des résultats a été effectuée sans à priori. A un « fold change » supérieur à 2, c'est à dire que l'expression transcriptionnelle est au moins multipliée ou divisée par 2 chez les souris THY-Tau22 par rapport à la condition contrôle, 28 gènes sont surexprimés et 4 sous-exprimés (Figure 29A). Parmi les 28 gènes surexprimés, la proportion de gènes codant pour une protéine impliquée dans les différents aspects fonctionnels du système immunitaire est significativement plus élevée que ce qu'elle devrait représenter : 13,8 à 34,5% selon l'aspect étudié chez les souris THY-Tau22 contre 0,3 à 6,9% chez les souris WT (Figure 29B). On dénombre ainsi au total 13 gènes impliqués dans des fonctions immunitaires surexprimés dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 qui sont dans l'ordre décroissant en fonction du « fold change » : *Clec7a*, *Itgax*, *Ccl3*, *Cst7*, *Cd74*, *Ccl4*, *Cxcl5*, *Ccl5*, *H2ab1*, *C3*, *Lect1*, *Cd52* et *Slamf9* (Figure 29A). Cette approche transcriptomique met alors en évidence une surexpression de marqueurs pro-inflammatoires dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 par rapport aux souris wt à 12 mois, suggérant la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire induite par la pathologie tau.

**A**

Probe name	Gene symbol	Gene title	Fold change	Genbank number
A_51_P387108	4930535E02Rik	AGENCOURT_10722792 NIH_MGC_169	93,68446	CA465081
A_51_P436977	Duox2	RIKEN full-length enriched library, clone:A430065P05	12,63958	AK079781
A_52_P1109289	TC1675885		11,851447	TC1675885
A_51_P246653	Clec7a	C-type lectin domain family 7, member a	7,679047	NM_020008
A_51_P432820	BC019382	Clone IMAGE:4501155	7,4789677	BC019382
A_51_P303424	Itgax	Integrin alpha X	4,764181	NM_021334
A_52_P428654	Zic1	Zinc finger protein of the cerebellum 1	4,0190926	NM_009573
A_51_P140710	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	3,8629282	NM_011337
A_51_P137419	Cst7	cystatin F (leukocystatin)	3,669093	NM_009977
A_51_P518001	Creb3l3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3	3,6290164	NM_145365
A_52_P203560	Fzd10	Frizzled homolog 10	3,5613635	NM_175284
A_51_P284608	Cd74	CD74 antigen	3,5592806	NM_010545
A_51_P509573	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	3,4782326	NM_013652
A_52_P295432	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	2,8717487	NM_009141
A_52_P638459	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2,843445	BC033508
A_51_P336770	Aebp1	AE binding protein 1	2,6929698	NM_009636
A_52_P361534	Wnt3	Wingless-related MMTV integration site 3	2,5428655	NM_009521
A_51_P215237	H2-Ab1	Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	2,537883	NM_207105
A_51_P110301	C3	Complement component 3	2,5081105	NM_009778
A_51_P444645	Lect1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	2,5005403	NM_010701
A_51_P404463	1500015O10Rik	RIKEN cDNA 1500015O10 gene	2,40736	NM_024283
A_51_P237307	Plekhg1	mRNA for mKIAA1209 protein	2,3514721	AK122468
A_51_P495780	S3-12	Plasma membrane associated protein, S3-12	2,2077477	NM_020568
A_51_P151126	Cd52	CD52 antigen	2,198185	NM_013706
A_51_P103222	Slc39a4	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	2,1261265	NM_028064
A_51_P435704	Tnni1	Troponin I skeletal, slow 1	2,0168436	NM_021467
A_51_P246066	Slamf9	SLAM family member 9	2,0142703	NM_029612
A_52_P61735	Flnc	Filamin C gamma	2,00962	NM_001081185
A_52_P482071	9330133O14Rik	RIKEN full-length enriched library, clone:C530046B12 product	-2,110493	AK049744
A_51_P181354	5330430B06Rik	RIKEN full-length enriched library, clone:5330430B06 product	-2,1227615	AK019920
A_51_P355943	Mvd	Mevalonate (diphospho) decarboxylase	-2,4439852	NM_138656
A_51_P298259	2310042E22Rik	RIKEN cDNA 2310042E22 gene	-3,0568125	NM_025634

**B**

Biological Process (GO term)	P-value	Sample frequency	Background frequency (MGI database)	Genes
GO:0006955 immune response	3.61e-06	8/29 (27.6%)	479/33218 (1.4%)	Ccl3 C3 H2-Ab1 Ccl4 Cd74 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0006954 inflammatory response	3.52e-05	6/29 (20.7%)	241/33218 (0.7%)	Ccl3 C3 Ccl4 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0006952 defense response	8.53e-05	7/29 (24.1%)	474/33218 (1.4%)	Ccl3 C3 Ccl4 Cd74 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0002376 immune system process	2.25e-04	8/29 (27.6%)	820/33218 (2.5%)	Ccl3 C3 H2-Ab1 Ccl4 Cd74 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0009611 response to wounding	3.54e-04	6/29 (20.7%)	357/33218 (1.1%)	Ccl3 C3 Ccl4 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0006935 chemotaxis	1.64e-03	4/29 (13.8%)	111/33218 (0.3%)	Ccl3 Ccl4 Ccl5 Cxcl5
GO:0042330 taxis	1.64e-03	4/29 (13.8%)	111/33218 (0.3%)	Ccl3 Ccl4 Ccl5 Cxcl5
GO:0006950 response to stress	2.88e-03	8/29 (27.6%)	1154/33218 (3.5%)	Ccl3 C3 Creb3l3 Ccl4 Cd74 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0009605 response to external stimulus	6.20e-03	6/29 (20.7%)	587/33218 (1.8%)	Ccl3 C3 Ccl4 Ccl5 Clec7a Cxcl5
GO:0050896 response to stimulus	8.41e-03	10/29 (34.5%)	2279/33218 (6.9%)	Ccl3 Zic1 C3 Creb3l3 H2-Ab1 Ccl4 Cd74 Ccl5 Clec7a Cxcl5

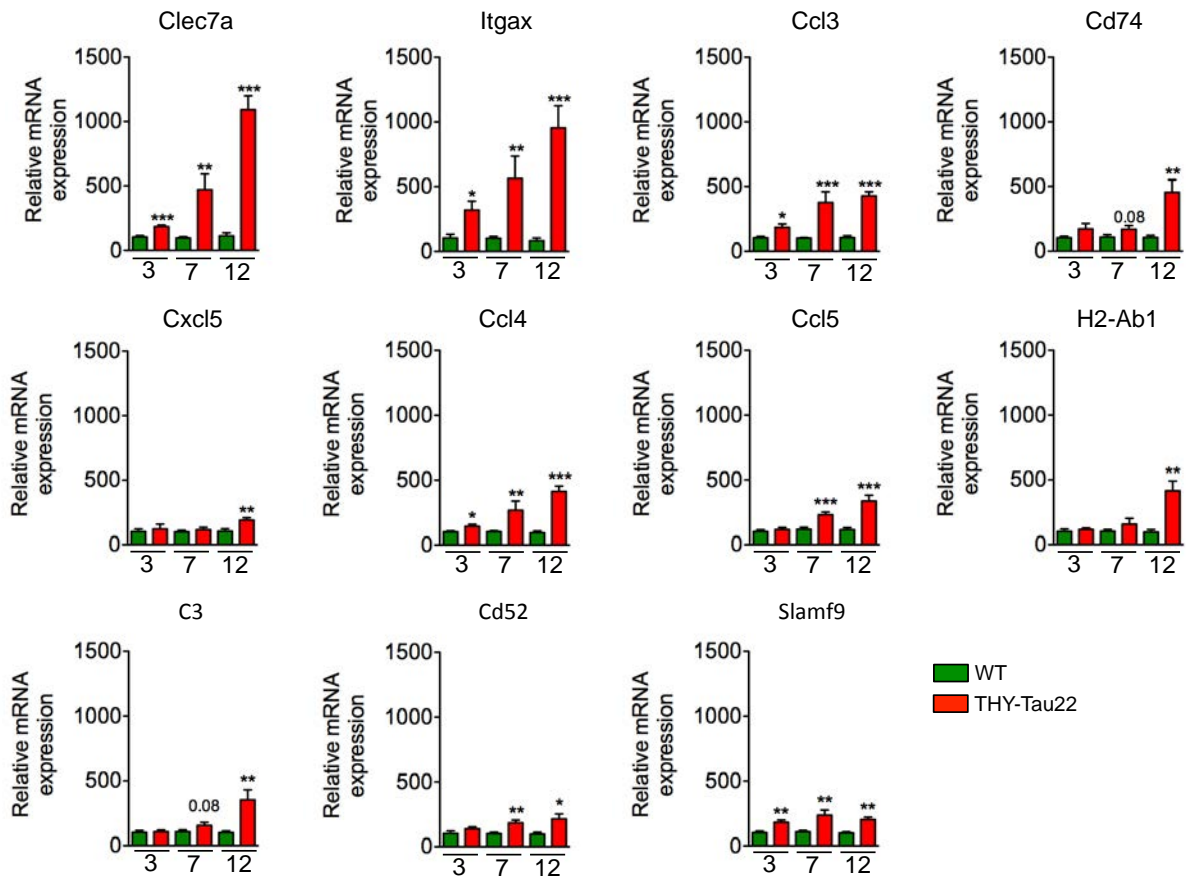
**Figure 29** Analyse des résultats de la micromatrice d'ADN. Seuls les gènes dont l'expression est modulée d'un facteur 2 entre les souris THY-Tau22 et wt figurent. 28 gènes sont alors surexprimés et 4 sous-exprimés (A). La proportion de gènes dont la protéine est impliquée dans différents aspects du système immunitaire est significativement plus élevée chez les animaux transgéniques que contrôles (B). Analyse statistique faite par le test t de Student.

## 2. Cinétique d'expression des marqueurs pro-inflammatoires au sein de l'hippocampe des souris THY-Tau22

La surexpression hippocampique des marqueurs pro-inflammatoires révélés par la micromatrice d'ADN, a fait l'objet d'une validation par RT-qPCR. Ces études transcriptionnelles ont été réalisées chez les souris THY-Tau22 à 3, 7 et 12 mois soit à un âge

où la pathologie tau est respectivement naissante, avancée et maximale. Il est alors possible d'évaluer la cinétique d'expression de ces différents marqueurs et d'observer une progression dans cette surexpression au cours du vieillissement des souris. L'analyse des résultats a été effectuée en prenant le groupe de souris wt âgé de 3 mois comme référence et placé à 100% afin de pouvoir observer l'évolution de l'inflammation dans les deux groupes au cours du vieillissement. On remarquera que le vieillissement des souris contrôles ne s'accompagne pas d'une élévation de l'expression des marqueurs inflammatoires étudiés à l'inverse de ce qu'il s'observe chez les souris THY-Tau22 (Figure 30). En fonction du marqueur étudié, la surexpression peut être très précoce et être significative (test t de student) dès l'âge de 3 mois comme c'est le cas pour *Clec7a* ( $p=0,0005$  à 3mois), *Itgax* ( $p=0,019$  à 3mois), *Ccl3* ( $p=0,0116$ ), *Ccl4* ( $p=0,040$  à 3 mois) , ou encore *Slamf9* ( $p=0,067$  à 3mois), alors que d'autres sont surexprimés significativement à partir de 7 mois tel que *Cd52* ( $p=0,0011$  à 7mois) et *Ccl5* ( $p=0,0004$  à 7mois) ou 12 mois comme *CD74* ( $p=0,002$  à 12mois), *H2-Ab1* ( $p=0,003$  à 12mois) et *Cxcl5* ( $p=0,008$  à 12mois) chez les souris THY-Tau22. Ces résultats démontrent alors une corrélation entre la progression de la pathologie tau hippocampique et la surexpression de ces marqueurs pro-inflammatoires.

L'obtention de ces résultats nécessite une certaine compréhension du rôle joué par ces marqueurs au sein de la fonction immunitaire. Les protéines *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5* et *Cxcl5* appartiennent ainsi à la famille des chémokines et sont donc plutôt impliqués dans le chimiotactisme alors que l'opsonine *C3* appartient au système du complément et participe entre autre aux phénomènes de phagocytose, ce qui en fait un marqueur de l'immunité innée. La fonction d'*Itgax*, de *Cd74*, de *H2ab1*, de *Cd52* et de *Slamf9*, a fait l'objet d'un nombre restreint d'études. Il semblerait toutefois que *Clec7a* (Dectin-1) soit un récepteur de surface impliqué dans la reconnaissance de certains motifs antigéniques et appartiendrait donc à l'immunité innée (Van Kooyk, 2008). Concernant *Itgax* (CD11c), il s'agit d'une intégrine qui est utilisée comme marqueur de cellules dendritiques et qui semble impliquée dans la présentation de l'antigène et le trafic des lymphocytes à travers la BHE (Fisher et al., 2011). *H2ab-1* et *CD74* sont quant à elles deux protéines appartenant au système du CMH de type 2 et qui présentent donc une fonction dans la reconnaissance antigénique. *Slamf9* est quant à lui un corécepteur qui semble impliqué dans l'activation lymphocytaire (Detre et al., 2010) alors que *CD52* est retrouvé à la surface des lymphocytes matures et constitue une cible thérapeutique dans la sclérose en plaque (Brown et Coles, 2013). Ces marqueurs appartiennent



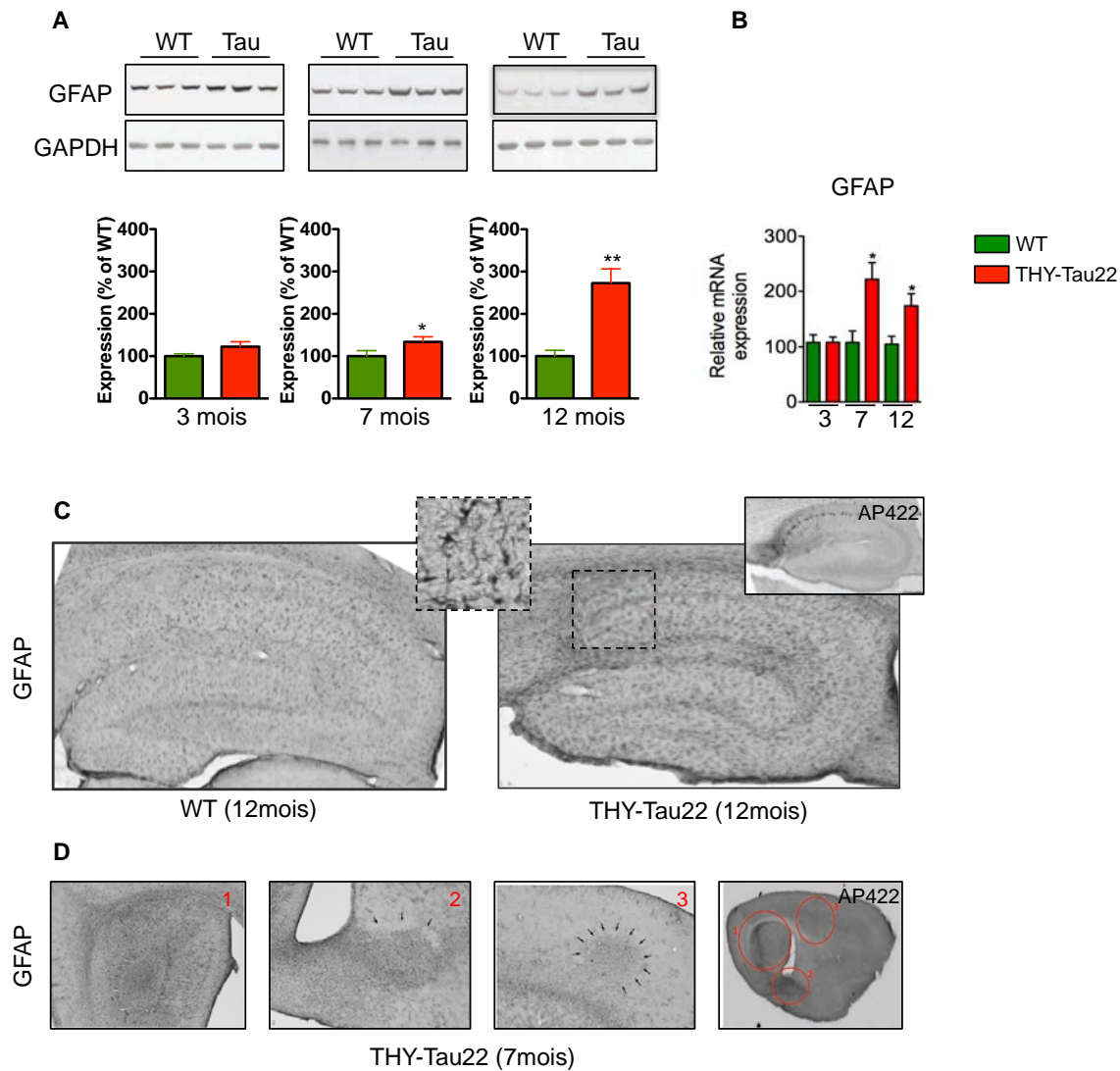
**Figure 30** Cinétique d'expression hippocampique des marqueurs pro-inflammatoires révélés par la micromatrice d'ADN chez les souris THY-Tau22 et wt à 3, 7 et 12 mois. Le groupe wt 3 mois est pris comme référence pour l'analyse des résultats afin de comparer l'évolution de l'expression du marqueur au cours du vieillissement. Les souris THY-Tau22 surexpriment *Clec7a*, *Itgax*, *Ccl3*, *Cd74*, *Ccl4*, *Cxcl5*, *Ccl5*, *H2-Ab1*, *C3*, *Cd52* et *Slamf9* confirmant de fait les résultats obtenus par transcriptomique. Cette surexpression est progressive au cours du vieillissement avec une cinétique différente selon le marqueur étudié. Il existe alors une corrélation avec le développement de la pathologie tau hippocampique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  wt vs THY-Tau22 du même âge en test t de Student.  $n = 6$  à 13 par groupe.

donc à différents aspects fonctionnels du système immunitaire qu'il s'agisse de l'immunité innée, de la libération chémokinique ou encore de l'activation lymphocytaire. Ces différents paramètres ont alors été investigués plus en détail par des approches complémentaires chez les souris THY-Tau22.

### 3. Les souris THY-Tau22 présentent une activation astrogliale et microgliale

Les processus d'immunité innée ont été caractérisés chez la souris THY-Tau22 et notamment l'activation astrogliale et microgliale. L'activation astrogliale a été révélée en mesurant l'expression hippocampique de la GFAP (Glial fibrillary Acidic Protein) par électrophorèse monodimensionnelle et par RT-qPCR. Les résultats présentés en figure 31A-B démontrent un niveau d'expression significativement supérieur à 7 et 12 mois chez les souris THY-Tau22 par rapport aux souris non transgéniques : GFAP (+113,7±38,62% par rapport aux souris wt 7mois  $p=0,016$  ; +68,43±26,32% par rapport aux souris wt 12mois  $p=0,027$ ). Cette surexpression s'avère progressive de façon dépendante de l'âge suggérant la mise en place d'une activation astrogliale au cours du vieillissement dans le modèle THY-Tau22. L'immunohistochimie anti-GFAP réalisée dans le cerveau de souris THY-Tau22 âgées de 3, 7 et 12 mois confirme ces résultats et met en évidence une astrogliose dans l'hippocampe de ces souris comme observé ici à 12 mois (Figure 31-C). Il a par ailleurs été observé une densité plus élevée du nombre d'astrocytes marqués à la GFAP à proximité de la DNF (révélée par l'anticorps AP422) à 3 mois (non montré), 7 et 12 mois (Figure 31-C et D), ce qui s'est vérifié dans l'hippocampe mais également dans d'autres structures cérébrales (non montré). Ces résultats tendent à démontrer une activation astrogliale en parallèle du développement de la pathologie tau dans le modèle THY-Tau22.

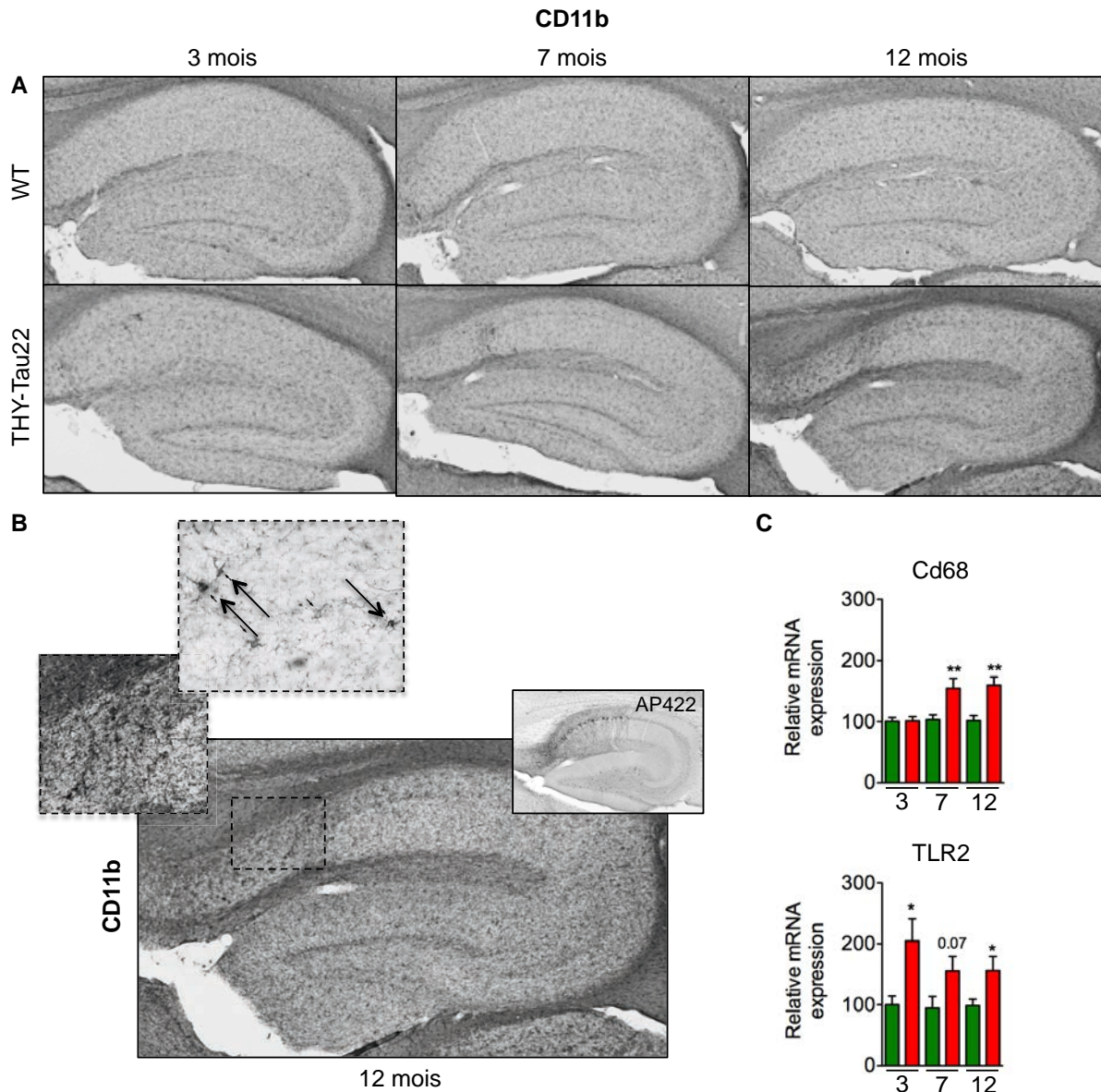




**Figure 31** Activation astrogliale au sein de l'hippocampe des souris THY-Tau22. L'étude par électrophorèse monodimensionnelle et RT-qPCR révèle une surexpression progressive de la GFAP au cours du vieillissement des souris THY-Tau22 par rapport aux souris contrôles (A-B), ce qui témoigne d'une activation astrogliale. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  wt vs THY-Tau22 du même âge en test t de Student. L'immunohistochimie anti-GFAP démontre une astroglie dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 comme ici à 12 mois (C). Le nombre d'astrocytes est plus important dans la vicinity de la DNF, qui est révélée par l'anticorps AP422 (C-D). Les cercles rouges (D-droite) indiquent la présence élevée de DNF. Ces résultats suggèrent une réponse astrogliale corrélée au développement de la pathologie tau.  $n = 5$  à 13 par groupe.

L'immunohistochimie anti-CD11b réalisée à 3, 7 et 12 mois a mis en évidence une augmentation du nombre de cellules microgliales marquées chez les souris THY-Tau22 par rapport aux souris contrôles (Figure 32-A), suggérant une activation microgliale. L'intensité

du marquage révèle une activation progressive au cours du vieillissement des souris transgéniques. Des observations à plus fort grossissement ont mis en évidence la présence de cellules microgliales activées au sein de l'hippocampe, dans le voisinage de la DNF, révélée



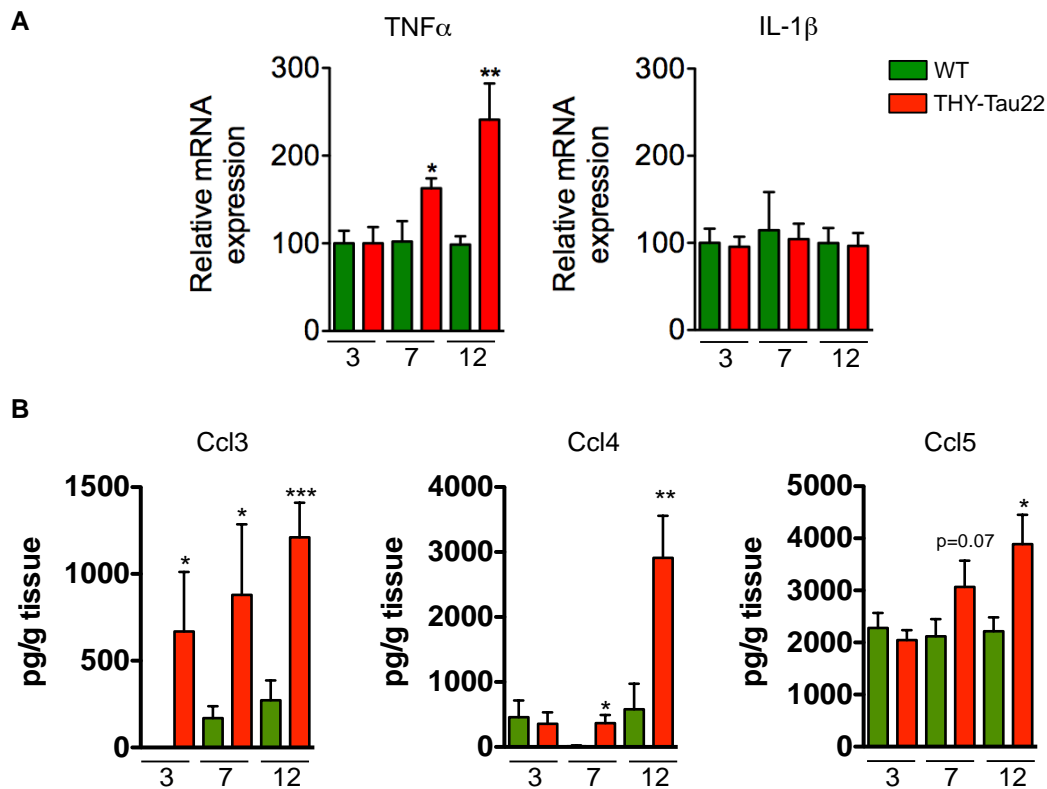
**Figure 32** Activation microgliale au sein de l'hippocampe des souris THY-Tau22. L'immunohistochimie anti-CD11b réalisée à 3, 7 et 12 mois a mis en évidence une activation progressive de la microglie au cours du vieillissement des souris THY-Tau22 (A). Les cellules microgliales activées se retrouvent dans la vicinity de la pathologie tau révélée par l'anticorps AP422 (B). Des études de qPCR révèlent une surexpression de CD68 et TLR2 chez les souris THY-Tau22, confirmant de fait l'activation microgliale observée. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  wt vs THY-Tau22 du même âge en test  $t$  de Student.  $n = 5$  à 13 par groupe.

par l'anticorps AP422 (Figure 32-B). L'activation microgliale pourrait donc être induite par la présence de DNF. Les protéines CD68 et TLR2 sont des marqueurs de l'activité microgliale couramment utilisés (Fernandez-Lizarbe et al., 2013 ; Johnson et al., 2013). Il a été observé une surexpression de ces derniers chez les souris THY-Tau22 notamment à 7 et 12 mois pour CD68 (+50,61±16,48% par rapport aux souris wt 7mois p=0,0063 ; +57,84±15,88% par rapport aux souris wt 12mois p=0,003) et dès 3 mois pour TLR2 (+104,7±36,41% par rapport aux souris wt 3mois p=0,0183; +60,82±30,51% par rapport aux souris wt 7mois p=0,074 ; +57,37±24,08% par rapport aux souris wt 12mois p=0,041) (Figure 32-C). De manière comparable à l'activation astrogliale, ces résultats témoignent d'une corrélation entre le développement de la pathologie tau et l'activation microgliale.

#### 4. Réponse chémokinique dans l'hippocampe des souris THY-Tau22

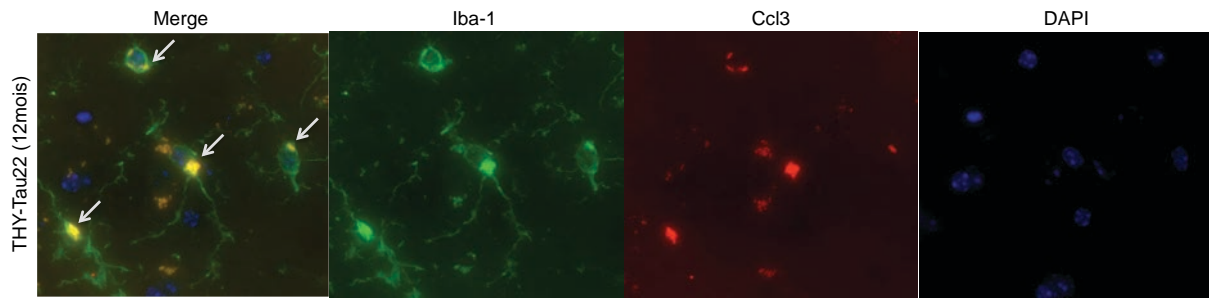
La mise en place d'une réponse astrogliale et microgliale s'accompagne par la libération de cytokines pro-inflammatoires, les plus précoces étant le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  (Nakamura, 2002). L'expression transcriptionnelle de ces dernières a alors été mesurée par qPCR dans le modèle THY-Tau22. Alors que le TNF $\alpha$  est surexprimé à 7 et 12 mois (+60,95±25,81% par rapport aux souris wt 7mois p=0,039 ; +142,5±40,46% par rapport aux souris wt 12mois p=0,0023), aucune différence n'est observée entre les deux génotypes concernant l'IL-1 $\beta$  (Figure 33-A). La réponse innée s'accompagne également de la sécrétion de facteurs chémokiniques impliqués dans le recrutement cellulaire. Les analyses transcriptomiques et transcriptionnelles ont révélé la surexpression hippocampique de Ccl3, Ccl4, Ccl5 et Cxcl5 chez les souris THY-Tau22 comme présenté précédemment dans les figures 29 et 30. Le dosage des chémokines Ccl3, Ccl4 et Ccl5 au sein de l'hippocampe et réalisé par ELISA, a permis d'observer que cette surexpression s'accompagne d'une élévation de leur production. Il a en effet été mis en évidence une augmentation précoce des niveaux de Ccl3 (dès 3 mois) chez les souris THY-Tau22 qui se poursuit de façon dépendante de l'âge (+669,2±342,3 par rapport aux souris wt 3mois p=0,039; +710,6±380,5% par rapport aux souris wt 7mois p=0,044 ; +937,8±221,2% par rapport aux souris wt 12mois p=0,0007). La concentration des chémokines Ccl4 (+354,3±145,2% par rapport aux souris wt 7mois p=0,0156 ; +2330±754,8% par rapport aux souris wt 12mois p=0,0058) et Ccl5 (+947,9±625,8% par rapport aux souris wt 7mois p=0,076 ; +1676±623,3% par rapport aux souris wt 12mois p=0,011) s'élèvent quant à elles plus tardivement dans le modèle (Figure 33-B).

La libération de ces chémokines mais surtout de Ccl3 s'effectue alors en parallèle de la progression de la pathologie tau hippocampique.



**Figure 33** Réponse cytokinique. Les souris THY-Tau22 présentent une surexpression progressive de TNF $\alpha$ , aucune différence d'expression entre les deux génotypes concernant IL-1 (A). Le dosage par ELISA des chémokines Ccl3, Ccl4 et Ccl5 à 3, 7 et 12 mois révèle une libération précoce de Ccl3 dans le modèle suivi de Ccl4 et Ccl5 (B). Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  wt vs THY-Tau22 du même âge en test t de Student.  $n = 5$  à 13 par groupe.

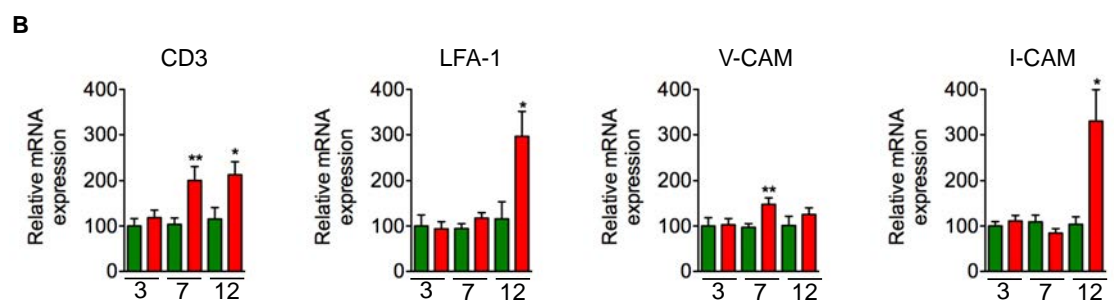
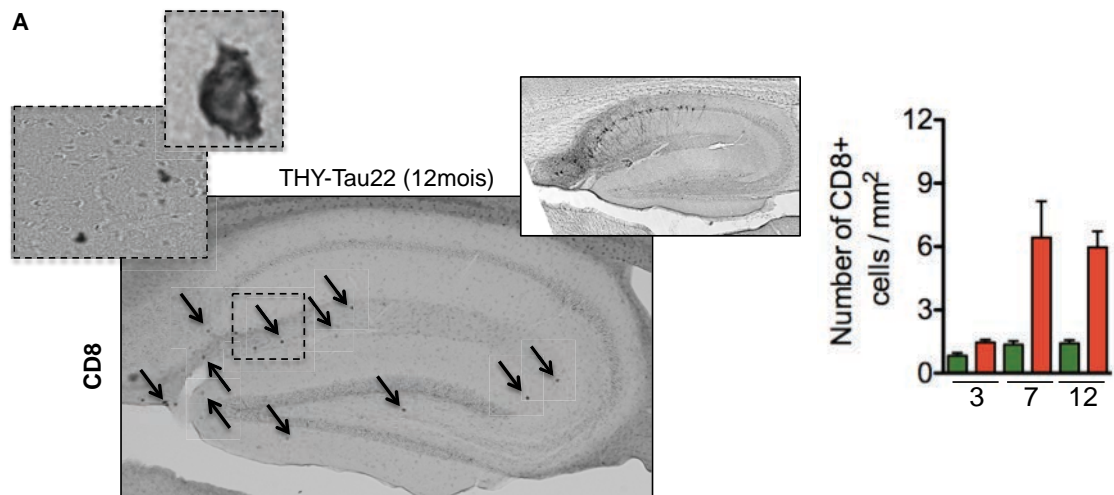
L'origine cellulaire de Ccl3 a été identifiée par une approche d'immunofluorescence. La colocalisation des marquages Iba-1 (vert) et Ccl3 (rouge) a permis d'observer la chémokine à l'intérieur de cellules microgliales activées marquées ici par Iba1 (Figure 34), suggérant une synthèse et libération microgliale de Ccl3. D'autres origines cellulaires ne sont toutefois pas à exclure. En effet, il a été observé une surexpression astrocytaire de Ccl3 dans des modèles d'épilepsie (Guzik-Kornacka et al., 2011).



**Figure 34** Origine cellulaire de Ccl3. La colocalisation des marquages Ccl3 et Iba1 (flèches blanches) révèle une origine microgliale de la production de Ccl3 observée chez les souris THY-Tau22. Photographie de la région CA1 de l'hippocampe à fort grossissement.

## 5. Infiltration lymphocytaire chez les souris THY-Tau22

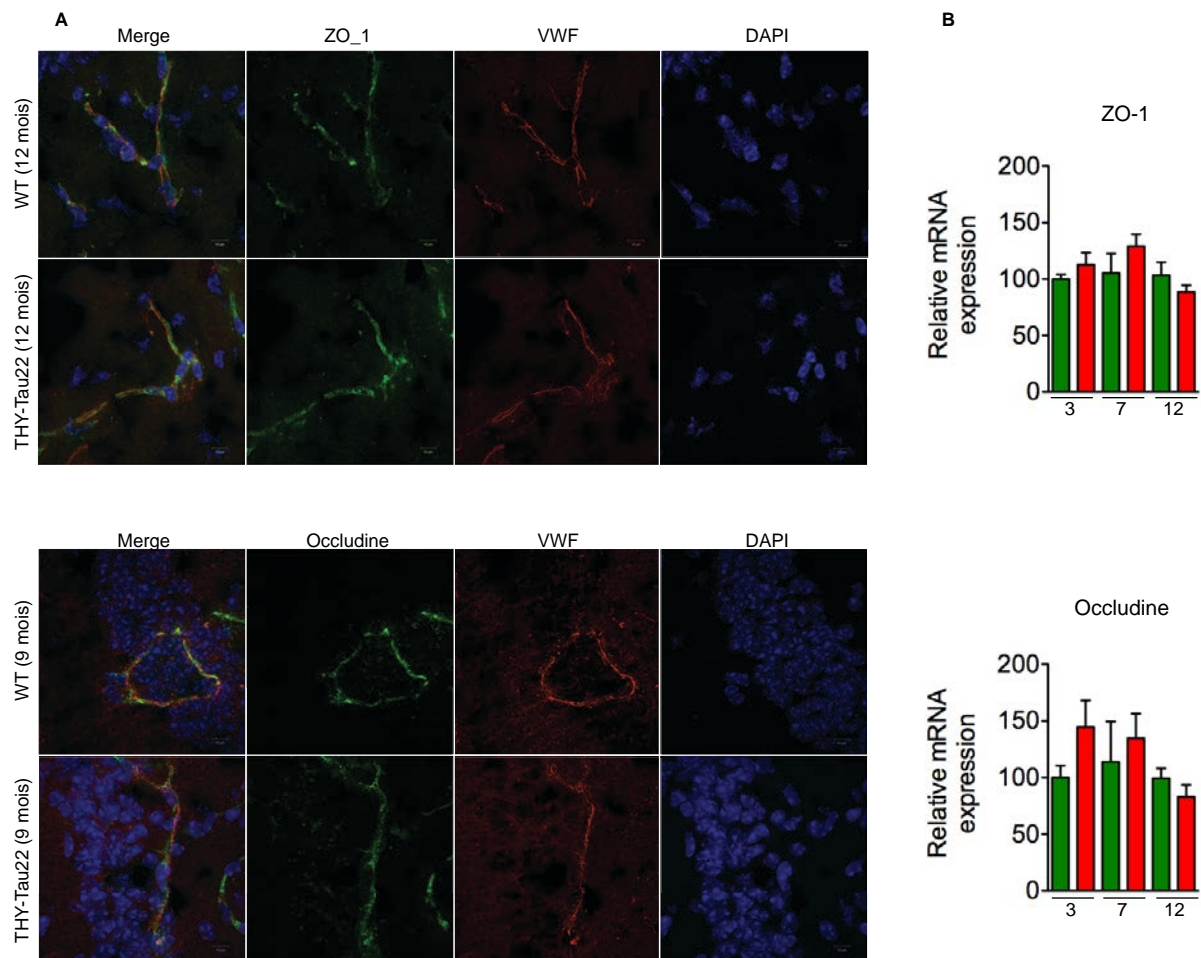
La présence des chémokines Ccl3, Ccl4 et Ccl5 au sein de l'hippocampe des souris THY-Tau22 évoque une possible infiltration de leucocytes circulants et qui, en raison de la surexpression des marqueurs CD52 et Slamf9 chez ces souris (Figure 30), pourrait être de nature lymphocytaire. Par ailleurs, la surexpression hippocampique de CD3 (+96,59±28,91% par rapport aux souris wt 7mois  $p=0,0034$  ; +96,32±38,11% par rapport aux souris wt 12mois  $p=0,025$ ) à 7 et 12 mois (Figure 35-B), suggère la présence de lymphocytes T dans le modèle THY-Tau22. Afin de vérifier cette assertion, des études d'immunohistochimie utilisant des anticorps dirigés contre les protéines CD4 et CD8, 2 marqueurs identifiant des populations de lymphocytes T différentes, ont été réalisées à 3, 7 et 12 mois dans le cerveau des souris contrôles et transgéniques. Alors que l'immunohistochimie anti-CD4 n'a révélé qu'un nombre extrêmement limité de cellules CD4<sup>+</sup> quelque soit l'âge de l'animal (non montré), l'utilisation de l'anticorps CD8 a mis en évidence un nombre important de cellules CD8<sup>+</sup> infiltrées dans le cerveau des souris THY-Tau22 âgées de 7 et 12 mois (Figure 35-A). L'analyse morphologique de ces cellules à plus fort grossissement permet de confirmer leur nature lymphocytaire. Aucun lymphocyte n'est retrouvé chez les souris THY-Tau22 à 3 mois ou encore chez les souris wt. Enfin, à l'instar de ce qui a été observé pour les cellules astrogliales ou microgliales, la localisation des lymphocytes CD8<sup>+</sup> se retrouve dans la vicinity de la pathologie tau comme ici dans l'hippocampe (Figure 35-A), mais cela se vérifie également dans d'autres structures cérébrales (non montré).



**Figure 35** Infiltration lymphocytaire. L'immunohistochimie anti-CD8 révèle la présence de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> (flèche) dans les régions où la pathologie tau, révélée par l'anticorps AP422, est importante comme ici dans l'hippocampe. Le nombre de ces lymphocytes est élevé chez les souris THY-Tau22 âgées de 7 et 12 mois avec environ 6 cellules/mm<sup>2</sup> contre moins de 1 chez les souris wt ou THY-Tau22 âgées de 3 mois (A). Les études transcriptionnelles réalisées en qPCR viennent confirmer cette progression dans l'infiltration lymphocytaire (CD3), mais en donnent également un mécanisme mettant en jeu l'intégrine LFA-1 ou les molécules d'adhésion V-CAM et I-CAM suggérant une infiltration par diapédèse (B). Vert WT / Rouge THY-Tau22. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe ± écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  wt vs THY-Tau22 en test t de Student.  $n = 5$  à 13 par groupe.

Afin de discriminer les modalités de passage de ces lymphocytes jusqu'au cerveau et donc à travers la BHE, nous avons observé l'expression transcriptionnelle des molécules d'adhésion LFA-1, I-CAM et V-CAM dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 qui sont décrites comme participantes au phénomène de diapédèse cellulaire. Il s'avère que leur expression est augmentée à 7 ou 12 mois par rapport aux souris contrôles selon le marqueur étudié LFA1 (+180,7±69,59% par rapport aux souris wt 12mois  $p=0,028$ ), V-CAM (+50,89±15,33% par rapport aux souris wt 7mois  $p=0,0038$ ), I-CAM (+226,3±78% par rapport aux souris wt

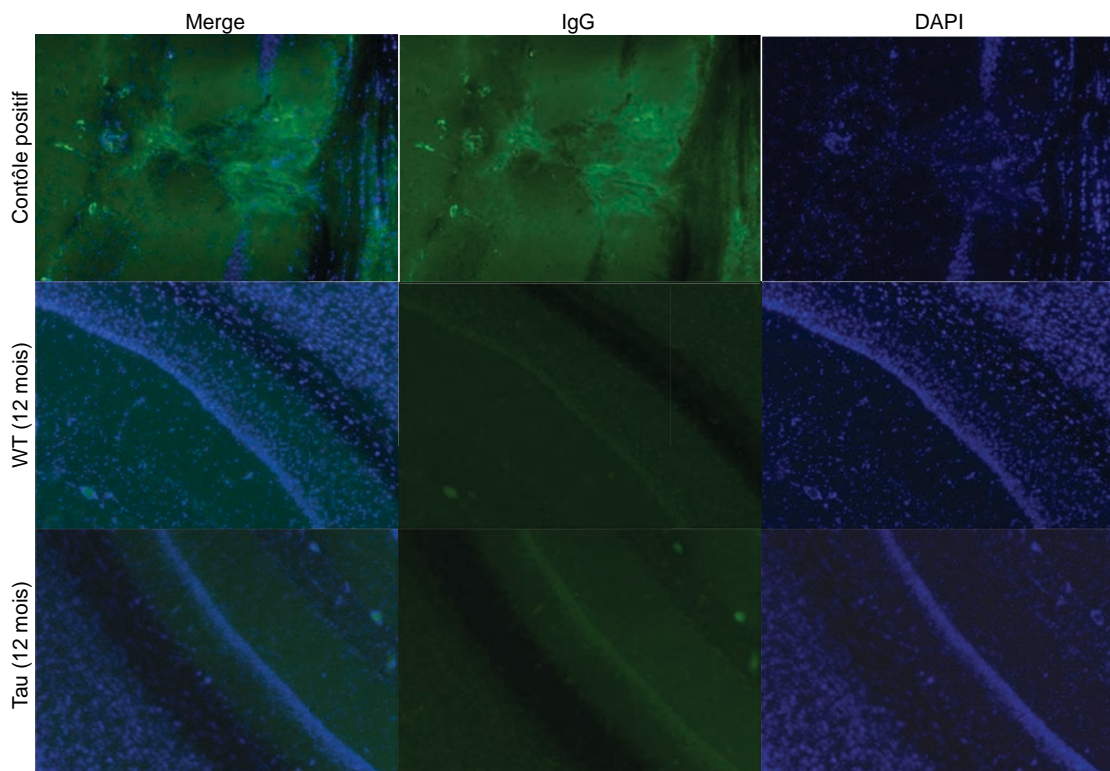
12mois  $p=0,0176$ )(Figure 35-B), ce qui peut suggérer une diapédèse lymphocytaire conduisant à la présence de lymphocyte au sein du cerveau.



**Figure 36** Absence de rupture de la BHE chez les souris THY-Tau22. L'intégrité de la BHE a été étudiée au travers du profil d'expression de ZO-1 et de l'occludine (vert) par immunofluorescence. Les photographies ont été prises dans la CA1. Le VWF (rouge) est une glycoprotéine structurale de l'endothélium. La continuité du marquage ZO-1 et occludine associée au marquage VWF chez les souris THY-Tau22 âgées de 12 mois, témoigne d'une absence d'altération majeure de la BHE (A), qui est appuyé par l'absence de modification transcriptionnelle de ZO-1 et occludine (B). Les résultats de qPCR sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne.

Parce que l'infiltration lymphocytaire peut s'accompagner ou résulter d'une altération de la BHE, ce paramètre a également été évalué dans l'hippocampe des souris THY-Tau22. La morphologie des jonctions serrées a alors été examinée en observant le profil d'expression par immunofluorescence des protéines ZO-1 (Zonula Occludens 1) et occludine, deux marqueurs constituant ces jonctions. Un marquage continu, fort et linéaire de ces protéines a été observé

au sein de la vasculature cérébrale identifiée par le VWF (Von Willebrand Factor) qui est constitutivement exprimé par l'endothélium, ce qui en fait un bon marqueur structural. Cet agencement continu de ZO-1, de l'occludine et du VWF chez les souris THY-Tau22 âgées de 12 mois témoigne d'une absence d'altération majeure de l'intégrité de la BHE (Figure 36-A). De la même manière, l'expression transcriptionnelle de ZO-1 et de l'occludine a été retrouvée identique entre les 2 génotypes quelque soit l'âge (Figure 36-B). Ces résultats sont en accord avec des études d'imagerie cérébrale effectuées dans le modèle via du gadolinium (non publié).



**Figure 37** Extravasation des IgG révélée par immunofluorescence au sein de la CA1 de l'hippocampe. Le contrôle positif a été obtenu en lésionnant l'hippocampe, induisant de fait une perte d'intégrité structurale de cette région et donc de la BHE. Les IgG « emprisonnées » dans le compartiment vasculaire sont alors libérées et peuvent gagner le parenchyme cérébral. On peut voir dans le contrôle positif (haut) que le marquage anti-IgG (vert) est présent au niveau de la lésion, observable dans la fenêtre DAPI qui colore l'ADN (bleu) par une rupture dans la couche CA1. Les souris THY-Tau22 (Bas) ne présentent quant à elles aucune extravasation d'IgG dans la CA1 ni même dans d'autres régions et ont une expression comparable à ce qui est observé chez les souris wt.

Enfin l'extravasation des immunoglobulines a été évaluée par immunofluorescence afin de confirmer par une seconde approche l'absence d'altération majeure de la BHE. La libération



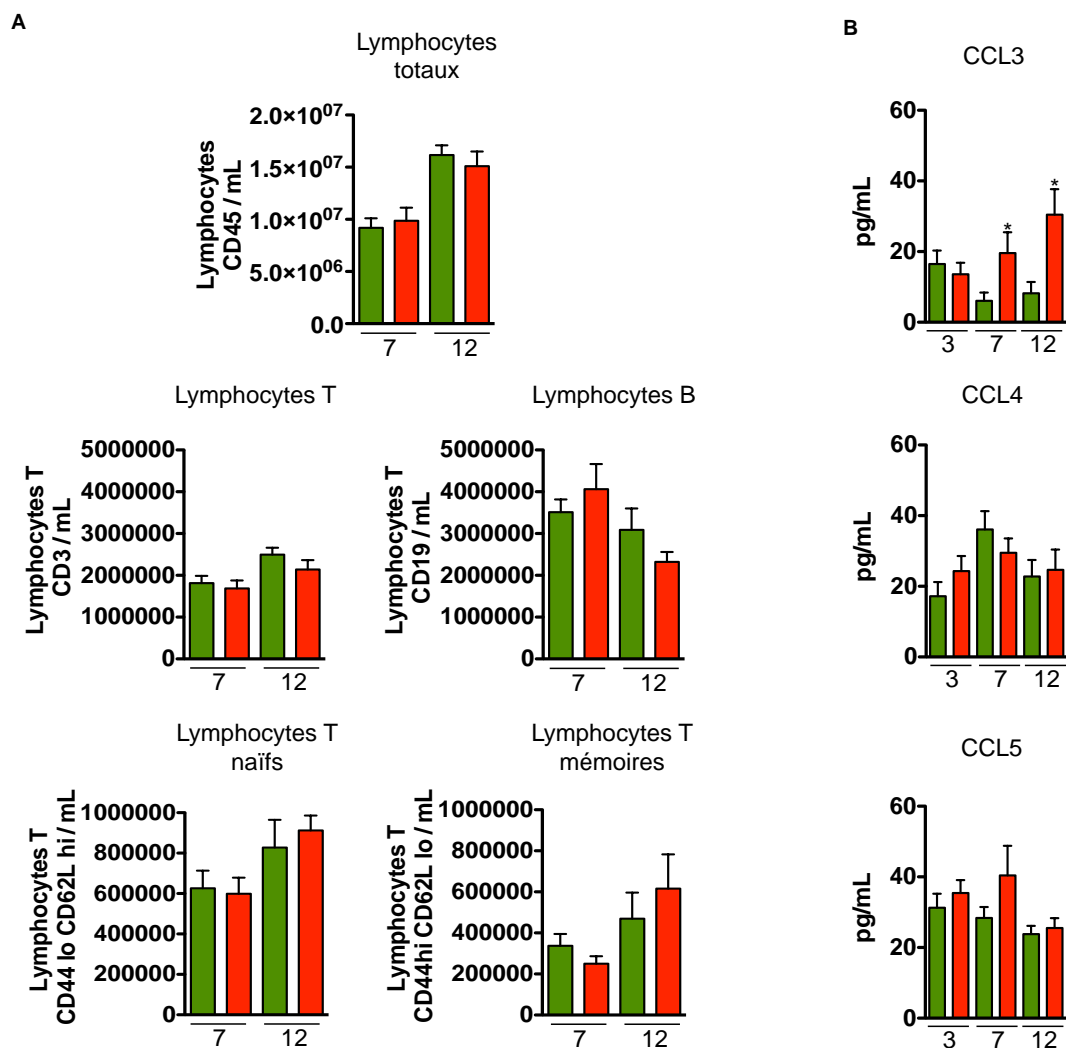
des IgG du compartiment vasculaire au parenchyme cérébral témoigne en effet d'une rupture de son intégrité comme c'est le cas dans le contrôle positif où un marquage dense anti-IgG se retrouve au niveau de la CA1 de l'hippocampe ayant subi une lésion (Figure 37). En revanche, aucun marquage n'est retrouvé chez les souris wt et THY-Tau22 à 12 mois, confirmant l'absence d'une rupture de l'intégrité de la BHE (Figure 37).

## 6. Les souris THY-Tau22 présentent une inflammation périphérique limitée

La présence d'une infiltration lymphocytaire centrale chez les souris THY-Tau22 peut suggérer une prolifération et une activation préalable de ces lymphocytes en périphérie, nous conduisant à effectuer une numération lymphocytaire du sang total par cytométrie de flux. Les cellules marquées par l'anticorps CD45 définissent l'ensemble des cellules leucocytaires. En fonction de la granulosité, la population lymphocytaire peut être identifiée. Le nombre de lymphocytes totaux comptés à 7 et 12 mois ne révèle alors aucune différence entre les souris THY-Tau 22 et wt (Figure 39-A). L'utilisation des anticorps anti-CD3 et anti-CD19 permet de déterminer respectivement les lymphocytes T ( $CD45^+CD3^+$ ) et B ( $CD45^+CD19^+$ ). Le comptage de ces deux populations ne révèle également aucune différence entre les deux génotypes (Figure 39-A). Enfin les marqueurs CD44 et CD62L ont été utilisés afin d'identifier une population de lymphocytes T naïfs ( $CD45^+CD3^+CD62^{hi}CD44^{low}$ ) et de lymphocytes T mémoires préalablement activés ( $CD45^+CD3^+CD62^{low}CD44^{hi}$ ). Le comptage de ces populations ne révèle aucune différence chez les souris THY-Tau22 à 7 et 12mois. Ces résultats suggèrent une absence d'activation lymphocytaire périphérique.

Le dosage plasmatique des chémokines Ccl3, Ccl4 et Ccl5 a par ailleurs été réalisé par ELISA à 3, 7 et 12 mois. Alors que le niveaux des chémokines Ccl4 et Ccl5 ne diffère pas entre les deux groupes, il a été observé une augmentation significative des niveaux de Ccl3 à 7 et 12 mois chez les souris THY-Tau22 ( $+13,50\pm 5,97$  par rapport aux souris wt 7mois  $p=0,045$  ;  $+22,25\pm 7,91$  par rapport aux souris wt 12mois  $p=0,01$ ). Ces résultats mettent alors en évidence une possible participation de la chémokines Ccl3 périphérique dans l'infiltration lymphocytaire (Man et al., 2007), bien que son origine cellulaire n'ait pas été investiguée.

Nous avons enfin mis en évidence l'absence de protéine tau dans les oraganes lymphoïdes secondaire chez les souris THY-Tau22 (non montré), traduisant une inflammation périphérique induite par tau dans le modèle très limitée.



**Figure 39** Inflammation périphérique. Le comptage cellulaire par cytométrie de flux des différentes populations lymphocytaires (T, B, T naïfs, T mémoires) retrouvés dans le sang total des souris THY-Tau22 ne révèle aucune différence à 7 et 12 mois par rapport aux souris wt. n=5 à 8 par groupe (A). Le dosage plasmatique de Ccl3, Ccl4 et Ccl5 révèle une augmentation significative des niveaux de la seule chémokine Ccl3 chez les souris THY-Tau22 à 7 et 12 mois. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe ± écart à la moyenne. \*p<0,05, wt vs THY-Tau22 en test t de Student. n =6 à 13 par groupe.

## Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude de caractérisation révèlent la mise en place de processus neuro-inflammatoires de type innés dans le modèle de tauopathie THY-Tau22, mettant notamment en jeu une activation astrogliale et microgliale. De plus, cette étude est la première à mettre en évidence une sécrétion chémokinique précoce associée à une infiltration lymphocytaire cérébrale dans un tel modèle exempt de mort neuronale.

Les souris THY-Tau22 développent une pathologie tau hippocampique progressive qui débute dès 3 mois pour atteindre un maximum vers l'âge de 9-10 mois. La surexpression de la GFAP et des marqueurs CD68, TLR2 et CD11b révèlent respectivement une augmentation de la réponse astrogliale et microgliale chez ces souris de manière relativement précoce. Cette réponse immunitaire innée s'intensifie au cours du vieillissement et se corrèle à la progression de la pathologie tau. Par ailleurs, les études d'immunohistochimie ciblant les protéines GFAP et CD11b démontrent une astrogliose et une activation microgliale dans les régions les plus affectées par la pathologie tau, suggérant une réponse induite par tau. Une réponse immunitaire innée associée à la présence de DNF a déjà été observé chez les patients atteints de FTDP-17 (Bellucci et al., 2011) ou dans le modèle P301S (Bellucci et al., 2004 ; Yoshiyama et al., 2007), parfois précédant le développement de la pathologie tau (Yoshiyama et al., 2007). La présence d'une mort neuronale précoce dans ce dernier modèle ne permet toutefois pas d'exclure une réponse neuro-inflammatoire en partie indépendante de tau, contrairement à notre modèle THY-Tau22.

A l'inverse des plaques neuritiques extracellulaire composées d'A $\beta$  fibrillaire, la DNF est intra-neuronale rendant difficile sa détection par les premières cellules immunitaires, notamment en absence de mort neuronale. Toutefois, la sécrétion d'oligomères de tau phosphorylés par exosomes peut contribuer à sa présence dans le milieu extracellulaire facilitant alors la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire (Saman et al., 2012). De plus, il a récemment été observé que la transfection de tau 40 (tau humaine 2N/4R) dans une lignée microgliale de rat induit une accumulation membranaire de protéines tau phosphorylées (Ser396/404) en parallèle d'une augmentation de l'activité microgliale (Wang et al., 2013). La présentation d'épitopes hyperphosphorylés de tau au niveau membranaire

pourrait alors permettre d'initier une réponse de la microglie. Enfin, les espèces tronquées de tau peuvent également participer au développement de cette réponse (Zilka et al., 2009).

La colocalisation de cellules microgliales activées et des dépôts extracellulaires amyloïdes a été observé dans le cerveau de patients atteints de la MA (Edison et al., 2008 ; Yokokura et al., 2011). Or il semble que cette réponse microgliale soit bénéfique vis à vis de la lésion amyloïde puisqu'elle est associée à une clairance des dépôts, notamment par phagocytose (El Kourry et al., 2007). En effet, les TLRs tels que TLR2/4/9 (Tahara et al., 2006), ou encore CR3 (Fu et al., 2012), sont autant de récepteurs présents à la surface des cellules microgliales capables de fixer et phagocyter A $\beta$ . A ce jour, aucun récepteur capable de lier et phagocyter tau n'a été mis en évidence. Toutefois, l'étude de Wang et al., 2013 a démontré une augmentation du potentiel de phagocytose de la microglie après transfection de tau40, pouvant suggérer un possible rôle dans la clairance de la DNF. Les études réalisées à ce jour tendent plutôt à démontrer un rôle délétère de l'activation microgliale (induite par le LPS) vis à vis de la pathologie tau (Kitazawa et al., 2005 ; Bhaskar et al., 2010 ; Lee et al., 2010 ; Sy et al., 2011). Ces effets semblent néanmoins être dus à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et donc du profil d'activation microgliale (M1 vs M2). Des études fonctionnelles sont nécessaires pour déterminer le rôle de cette réponse microgliale dans le modèle THY-Tau22.

Nous avons observé une surexpression progressive du TNF $\alpha$  chez les souris THY-Tau22. Or il a été observé *in vitro* que cette cytokine peut promouvoir l'agrégation de la protéine tau (Gorlovoy et al., 2009), suggérant sa possible participation dans le développement de la pathologie tau du modèle. Plus largement, il aurait été intéressant de mesurer le profil d'expression cytokinique par l'intermédiaire de biopuces. D'autres médiateurs de l'inflammation aurait alors pu être mis en évidence comme cela a été fait dans le modèle hTau. Chez ces souris, il a en effet été observé une corrélation positive entre la phosphorylation de tau aux épitopes Ser396/404 et l'expression corticale de certaines cytokines notamment IL-6, IL-10, CCL2, CCL11 et CCL12 (Garwood et al., 2010). La réduction de la réponse neuro-inflammatoire par un traitement à la minocycline s'accompagne alors d'une réduction de la phosphorylation de tau à cet épitope (Garwood et al., 2010). La corrélation existante entre le développement progressif de la pathologie tau et de la réponse neuro-inflammatoire dans la lignée THY-Tau22 pourrait donc s'expliquer par une incidence du dernier sur le premier.

Les souris THY-Tau22 présentent également des altérations comportementales progressives qui résultent du développement de la pathologie tau hippocampique (Van der

Jeugd et al., 2013a ; et Burnouf et al., 2013). Ces altérations comportementales peuvent également résulter du développement de la réponse microgliale. En effet, il a été observé que 50% des patients présentant des troubles cognitifs modérés (MCI) avait une augmentation de l'activité microgliale (Okello et al., 2009). Au contraire, la réduction de cette dernière par la minocycline améliore la mémoire spatiales de souris âgées (Kohman et al., 2013). L'astroglie et l'activation microgliale présentes chez les souris THY-Tau22 peuvent donc, au travers de la libération de cytokines pro-inflammatoires promouvoir la pathologie tau hippocampique, ce qui a des répercussions sur les altérations comportementales, mais peuvent également directement influencer sur le statut cognitif de ces souris indépendamment de tau.

Une élévation des niveaux de chémokines a été observé dans le LCR de patients atteints de la MA mais également chez des patients atteints de démences fronto-temporales (Galimberti et al., 2006 ; Corrêa et al., 2011). Dans notre modèle de tauopathie THY-Tau22, nous avons observé de manière intéressante une élévation des niveaux de Ccl4 et Ccl5 ainsi que de Ccl3 de manière très précoce. Leurs relations vis à vis de la pathologie tau ne sont actuellement pas connues. Il a néanmoins été observé une corrélation entre les niveaux de Ccl2 et P-Tau dans le LCR de patients atteints de la MA (Corrêa et al., 2011), toutefois, aucune variation de Ccl2 n'a été observé dans notre modèle (non montré). De la même manière, très peu d'étude a évalué l'impact de ces chémokines sur la cognition. Il a toutefois été mis en évidence une corrélation entre les niveaux de Ccl3/4 et le développement de troubles mnésiques dans un modèle de pathologie amyloïde (Song et al., 2011). De plus, une réduction des déficits cognitifs induit par A $\beta$  a été observée chez des souris déficientes en Ccl3 (Passos et al., 2009). Enfin une réduction des déficits cognitifs a été observée dans un modèle murin de sclérose en plaque (EAE) ayant subi un régime cétogénique. Ce traitement réduit en parallèle la sécrétion cytokiniques et chémokiniques dont Ccl3 et Ccl4 (Kim et al., 2012a). Par ces études d'association, il semble que les chémokines puissent participer aux troubles cognitifs. Compte tenu de la pléiotropie des effets de ces chémokines et de la redondance de leurs actions, il est difficile d'étudier spécifiquement leurs effets sur la fonction cognitive. Une participation des chémokines surexprimées dans le développement d'altérations cognitives de notre modèle THY-Tau22 n'est toutefois pas à exclure.

Il est actuellement de plus en plus établi que les chémokines participent à la plasticité synaptique hippocampique dans des conditions non pathologiques (pour revue : Williamson et Bilbo, 2013). Or, une augmentation de l'activation microgliale et donc la génération d'une réponse neuro-inflammatoire telle qu'induite par le LPS, semble altérer la plasticité synaptique et notamment la LTP (Min et al., 2009), ce qui semble notamment impliquer

l'IL1 $\beta$  (Tong et al., 2012 ; Di Fillippo et al., 2013). De manière intéressante, l'administration centrale de LPS est associée à une réduction de la LTD NMDA-dépendante dans la CA1 (Min et al., 2009). Les dysfonctionnements fonctionnels des récepteurs NMDA et la perte de maintien de la LTD chez les souris THY-Tau22 (Van der Jeugd et al., 2011 ; Burnouf et al., 2013) pourraient donc provenir en partie de la réponse neuro-inflammatoire mise en place. Il n'a toutefois été mis en évidence aucun effet des chémokines et en particulier de Ccl3 à ce jour sur les altérations de maintien de la LTD dans ce modèle (données non publiées).

Nous avons observé en parallèle d'une augmentation de la sécrétion chémokinique une infiltration lymphocytaire parenchymateuse dans les régions riches en DNF. Cette infiltration lymphocytaire s'est effectuée en absence d'altérations majeures de l'intégrité de la BHE et a mis en jeu une surexpression de protéines d'adhésion cellulaires tel que LFA-1, I-CAM et V-CAM dont le rôle dans la transmigration des lymphocytes T au travers de la BHE a été largement décrit (pour revue : Engelhardt et Ransohoff, 2005). Bien qu'une augmentation de la perméabilité de la BHE ait été observée chez les patients atteints de la MA (Farrall et Wardlaw, 2009), il semble que cette ouverture soit majoritairement attribuable à A $\beta$  (Kook et al., 2012 ; Gheorghiu et al., 2013). Plusieurs études post-mortem ont dans ce contexte démontré la présence de lymphocytes dans le parenchyme cérébral de ces patients (Itagaki et al., 1988 ; Rogers et al., 1988 ; Togo et al., 2002). Toutefois, il s'agit de la première étude à mettre en évidence une infiltration lymphocytaire dans un modèle de tauopathie. Cette migration pourrait être le résultat d'une chémo-attraction médiée par les chémokines Ccl3 et Ccl5 ou encore le TNF $\alpha$ , comme observé dans des modèles in vitro de BHE (Ubogu et al., 2006 ; Man et al., 2007 ; Liu et al., 2008).

Le rôle de ces lymphocytes n'est actuellement pas clairement déterminé même s'ils participeraient plutôt à la clairance des plaques amyloïdes et joueraient donc plutôt un rôle bénéfique (Monsonogo et al., 2006 ; Fisher et al., 2010). Il a toutefois été observé que la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au peptide A $\beta$  varie en fonction de l'haplotype du CMH et de l'activité des lymphocytes T régulateurs (Toly-Ndour et al., 2011). D'autres études ont par ailleurs révélées dans un modèle de maladie de Parkinson, une implication de l'infiltration de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les processus de mort neuronale induit par le MPTP (Brochard et al., 2009). Dans des conditions physiologiques, la présence des lymphocytes se limite aux frontières du cerveau dans les régions dépourvues de BHE que définissent les organes circumventriculaires (Wilson et al., 2010). Cette localisation leur assure une fonction d'immunosurveillance (Engelhardt et Ransohoff, 2005). Dans ces conditions, les lymphocytes

T ont également des propriétés pro-cognitive, notamment via la sécrétion d'IL4 (Derecki et al., 2010 ; Derecki et al., 2011 et pour revue Kipnis et al., 2012). Compte tenu des altérations cognitives progressives dans le modèle THY-Tau22 et de la corrélation existante entre ce paramètre et l'infiltration de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, un rôle pro-cognitif de ces derniers semble peu probable. Toutefois un mécanisme compensateur ne peut être exclu. Des études plus approfondies sont alors nécessaires afin de déterminer les conséquences de cette infiltration dans le modèle THY-Tau22 ainsi que leur nature précise (effecteur ou régulateur ?). Dans la sclérose en plaque, il a par exemple été observé à la fois des effets neurotoxiques de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs alors que des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulateurs participent au rétrocontrôle de la réponse neuro-inflammatoire et ont alors davantage des effets neuro-protecteurs (pour revue Williams et al., 2011).

Enfin nous n'avons observé qu'une inflammation périphérique limitée au travers d'une élévation de Ccl3. L'expression périphérique de Ccl3 pourrait avoir une origine lymphocytaire et en ce sens participer à l'infiltration lymphocytaire (Man et al., 2007). Nous n'avons par ailleurs observé aucune activation lymphocytaire périphérique quelque soit l'âge des souris, suggérant une attraction de lymphocytes circulants naïfs qui seront activés au niveau central. Une élévation du nombre de lymphocytes circulants activés a été mis en évidence chez les patients atteints de la MA, toutefois, cette activation semble être la conséquence de la présence d'Aβ plasmatique (Pellicanó et al., 2012).

En conclusion, cette étude met en évidence le développement de différents processus neuro-inflammatoires dans un modèle de tauopathie telle qu'une activation astrogliale et microgliale mais également une sécrétion chémokinique associée à une infiltration lymphocytaire, le tout en absence de mort neuronale. La lignée THY-Tau22 constitue donc un bon modèle dans lequel étudier les différents processus neuro-inflammatoires imputables à la seule pathologie tau.





# Effets d'une consommation chronique de caféine dans le modèle THY-Tau22



## Effets d'une consommation chronique de caféine dans le modèle THY-Tau22

### Objectifs

La MA est une maladie multifactorielle dont la survenue est modulée par différents facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux mis en évidence par les études épidémiologiques, la consommation de caféine réduit notablement le risque de développer la MA (Maia et de Mendonça, 2002 ; Lindsay et al., 2002 ; Eskelinen et al., 2009). La caféine est une substance psychoactive dont les effets physiologiques sont essentiellement médiés par le blocage des récepteurs adénosinergiques  $A_1$  et  $A_{2A}$ . Ses effets vis à vis de la lésion amyloïde ont fait l'objet de plusieurs études expérimentales qui ont alors mis en évidence une réduction tant de la neurotoxicité aiguë du peptide  $A\beta$  (Dall'Igna et al., 2003 ; Dall'Igna et al., 2007), que de la pathologie amyloïde, ce dernier effet pouvant être imputable à une baisse de la production d' $A\beta$  (Arendash et al., 2006 ; Prasanthi et al., 2010) et/ou une élévation de sa clairance (Prasanthi et al., 2010 ; Abuznait et al., 2011 ; Qosa et al., 2012). A l'inverse, les effets de la caféine sur la pathologie tau sont actuellement très limités. Nous avons montré précédemment que ce modèle développe une réponse neuro-inflammatoire progressive corrélée à la mise en place de la pathologie tau. De plus, il a été observé que la caféine présente des effets anti-inflammatoires (Brothers et al., 2010). Dans la mesure où la neuro-inflammation a été décrite comme pouvant participer à la phosphorylation et l'agrégation de tau (Gorlovoy et al., 2009, Bhaskar et al., 2010), mais également aux altérations mnésiques (Jacewicz et al., 2009 ; Kohman et al., 2013), il sera alors intéressant de mesurer les conséquences de la caféine sur les déficits mnésiques et la réponse neuro-inflammatoire des souris THY-Tau22.

**L'objectif de ce travail de thèse fut donc d'évaluer les conséquences d'une consommation chronique de caféine sur le développement de la pathologie tau au travers du modèle THY-Tau22.**

# **Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's Disease-like Tau pathology**

Cyril Laurent, PhD<sup>1,2</sup>, Sabiha Eddarkaoui, MSc<sup>1,2</sup>, Maxime Derisbourg, MSc<sup>1,2</sup>, Antoine Leboucher, PhD<sup>1,2</sup>, Dominique Demeyer, BSc<sup>1,2</sup>, Sébastien Carrier, BSc<sup>1,2</sup>, Marion Schneider, BSc<sup>3</sup>, Malika Hamdane, PhD<sup>1,2</sup>, Christa E. Müller, PhD<sup>3</sup>, Luc Buée, PhD<sup>1,2,4</sup>, David Blum<sup>1,2,4</sup>

1. Université Lille-Nord de France, UDSL, F-59000, Lille, France

2. Inserm U837, Jean-Pierre Aubert Research Centre, IMPRT, F-59000, Lille France

3. PharmaCenter Bonn, Pharmaceutical Institute, University of Bonn, Germany

4. CHRU-Lille, F-59000, Lille France

Corresponding author: Dr. David Blum, Inserm U837, "Alzheimer & Tauopathies", Place de Verdun, 59045, Lille Cedex, France. Tel: +33320298858, Fax: +33320538562, e-mail:

david.blum@inserm.fr

## **Abstract**

Tau pathology found in Alzheimer's disease (AD) is crucial in cognitive decline. Epidemiological evidences support that habitual caffeine intake prevents memory decline during ageing and reduces the risk to develop Alzheimer's Disease. So far, experimental studies addressed the impact of caffeine in models mimicking the amyloid pathology of AD. In sharp contrast, effects of caffeine in a model of AD-like tauopathy remain unknown. Here, we evaluated effects of chronic caffeine intake (0.3 g/L through drinking water), given at an early pathological stage, in the THY-Tau22 transgenic mouse model of progressive AD-like Tau pathology. We found that chronic caffeine intake prevents from the development of spatial memory deficits in Tau mice. Improved memory was associated with reduced hippocampal Tau phosphorylation and proteolytic fragments. Moreover, caffeine treatment mitigated several pro-inflammatory markers found upregulated in the hippocampus of THY-Tau22 animals. Together, our data support that moderate caffeine intake is beneficial in a model of AD-like Tau pathology, paving the way for future clinical evaluation in AD patients.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Caffeine, Caffeine metabolites, Tau, THY-Tau22, transgenic

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by major memory impairments. Neuropathologically, AD is defined by the extracellular accumulation of A $\beta$  peptides into amyloid plaques and the presence of neurofibrillary tangles (NFT) made up of fibrillar aggregates of hyper- and abnormally phosphorylated Tau proteins (Sergeant *et al*, 2008). Tau hyperphosphorylation is observed early in the brain stem and entorhinal cortex and, in AD, the progression of the neurofibrillary lesions in the cortex – from entorhinal cortex, then hippocampus and lastly neocortex – corresponds to the progression of the symptoms (Braak *et al*, 2011), supporting a pivotal role of Tau pathology in AD-related memory impairments. Various genetic and environmental risk factors have been found to be associated with dementia and/or AD and several lifestyle-related factors such as physical exercise (Belarbi *et al*, 2011), anesthetics (Le Freche *et al*, 2012) or obesity/diabetes (Leboucher *et al*, 2013; Papon *et al*, 2013) modulate Tau pathology and associated memory disturbances.

The methylxanthine caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is the world's most popular psychoactive drug. Longitudinal studies suggested a benefit of caffeine consumption towards age-related cognitive decline. Other retrospective or prospective studies support that caffeine intake reduces AD risk (for review see Blum *et al*, 2013). In line, higher plasma caffeine levels were recently found to be associated with a reduced risk of dementia or a delayed onset in patients with mild cognitive impairments (Cao *et al*, 2012). So far, the pre-clinical impact of caffeine has been essentially evaluated in experimental models of amyloidogenesis. Notably, chronic caffeine intake through drinking water (0.3g/L) was found to improve memory and mitigate amyloid burden in APPsw transgenic mice (Arendash *et al*, 2009).

Accordingly, caffeine was also found to improve the life-span in A $\beta$ -expressing worms (Lublin *et al*, 2011). Other studies indicated that low to moderate doses of caffeine are able to protect from A $\beta$ -induced neuronal degeneration and memory impairments (Dall'Igna *et al*, 2003; Dall'Igna *et al*, 2007). In sharp contrast, effects of caffeine have never been evaluated in a model of AD-like Tau pathology. To address this question, we determined effects of chronic caffeine intake in the THY-Tau22 mouse model progressively developing hippocampal Tau pathology and spatial memory defects (Schindowski *et al*, 2006).

## **Material and methods**

**Animals and treatment.** THY-Tau22 male mice (C57Bl6/J background) were generated by overexpression of human 4-repeat Tau mutated at sites G272V and P301S under the control of Thy1.2 promoter (Schindowski *et al*, 2006). Non-transgenic littermates (WT) were used as controls. WT and THY-Tau22 mice were housed in a pathogen-free facility, 5 or 6 per cage (Techniplast cages 1284L), maintained on a 12h light/12h dark cycle with ad libitum access to food and water. Animals were randomized on body weight and caffeine (Sigma-Aldrich, France) was given to the animals through drinking water at the dose of 0.3g/L (according to Arendash *et al*, 2009) with groups as follows: WT/Water, n=10 ; WT/Caffeine, n=15; THY-Tau22/Water, n=10 ; THY-Tau22/Caffeine, n=11. Caffeine was kept in dark bottles and changed 2 times per week. Body weights were measured weekly. Water consumption was assessed all along the protocol for each experimental cage allowing to estimate the average consumption per mice during the whole treatment duration. Body temperature was evaluated at completion of protocol before behavioural evaluations. Caffeine treatment started at an age when Tau pathology and memory impairments are slight or even absent in THY-Tau22 mice (2 months) until 12 months of age, when transgenic mice exhibit full pathology and memory

disturbances (Schindowski *et al*, 2006; Van der Jeugd *et al*, 2013). All protocols were approved by an ethics committee (n°342012, CEEA).

**Spatial memory assessment using the Morris Water Maze.** Spatial memory abilities were examined in the standard hidden platform (PF) acquisition and retention version of the water maze, as previously described (Le Freche *et al*, 2012). A 100-cm circular pool was filled with water, opacified with non-toxic white paint (Viewpoint) and kept at 21°C. A 10-cm round platform was hidden 1 cm beneath the surface of the water at a fixed position. Four positions around the edge of the tank were arbitrarily designated 1, 2, 3, and 4; thus dividing the tank into four quadrants (clockwise): target (hidden-PF contained), adjacent 1, opposite, and adjacent 2. During the learning procedure, mice were tested during the light phase between 8:00 and 18:00. Each mouse was given four swimming trials per day (20 min intertrial interval) for five consecutive days. The start position (1, 2, 3, or 4) was pseudo-randomized across trials. A trial consisted of placing the mouse into the water facing the outer edge of the pool in one of the virtual quadrants and allowing it to escape to the submerged PF. A trial terminated when the animal reached the PF where it was allowed to remain for 15 s. If the animal failed to find the target before 120 s, it was manually guided to the PF where it was allowed to stay for 15 s. After completion of a trial, mice were removed from the pool and placed back to their home cages, beneath heat lamps in order to reduce the loss of temperature. Time required to locate the hidden escape platform (escape latency), and distance travelled to the hidden escape platform (path length) was recorded using the Ethovision XT tracking system (Noldus). Swimming speed (i.e. velocity, as a measure of possible motor defects that could interfere with their ability to perform in this task) was also measured. 72 hours following the acquisition phase, a probe trial was conducted. During this probe trial (60s), the platform was removed, search pattern of the mice was tracked again.



Proportion of time spent in the target quadrant versus averaged non-target quadrants was determined.

**Sacrifice.** At completion of the experiment (i.e when mice were 12 months of age), blood was collected, mice sacrificed without anesthesia, as the latter has been shown to promote Tau hyperphosphorylation through hypothermia (Planel *et al*, 2007) and brains removed. Hippocampi of each mouse were dissected out using a coronal acrylic slicer (Delta Microscopies) at 4°C and stored at -80°C until use for biochemical and mRNA analyses. Remaining brain tissue as well as plasma were respectively kept at -80°C and -20°C until dosage of caffeine and its metabolites.

#### **Quantitative determination of caffeine and metabolites in blood and brain samples.**

Brain samples were weighed and 2 mL of water containing 1% of formic acid were added to each sample. For determination of the recovery rate control samples were spiked with caffeine, theophylline, paraxanthine, and theobromine (1 µM and 10 µM, each). The tissues were then homogenized using an Ultra Turrax<sup>®</sup> (1 min, 25000 rpm at room temperature), subsequently vortexed for 1 min, and then treated in an ultrasonic bath for 5 min. The homogenates were then transferred to centrifugal filters (Amicon ULTRA 2 ml 3K) and centrifuged at 5445 g for 1 h. The obtained dialysate was transferred into high performance liquid chromatography (HPLC) vials and analysed as described below.

Mouse plasma samples were diluted 1:1 with water containing 1% formic acid. Control samples were spiked with a mixture of caffeine, theophylline, paraxanthine, and theobromine (final concentration: 1 µM and 10 µM each). The solutions were vortexed for 1 min and then treated in an ultrasonic bath for 5 min. The samples were then transferred to centrifugal filters (Amicon ULTRA 2ml 3K) and centrifuged for 15 min at 5445 g. The obtained dialysates

were directly transferred into HPLC vials.

Mass spectra were recorded on an API 2000 (AB SCIEX, Darmstadt, Germany) mass spectrometer with a turbo ion source ionization (electrospray ionization, ESI) coupled with an Agilent 1100 HPLC system (Agilent, Böblingen, Germany) using a C18 column (EC50/2 NUCLEODUR C18 gravity 3  $\mu\text{m}$ , Macherey und Nagel, Düren, Germany). A solvent gradient was run from 90 % A (water containing 0.25% formic acid, 2 mM ammonium acetate) and 10% B (methanol containing 2 mM ammonium acetate) to 40 % A and 60% B within 12 min, followed by rinsing for 10 min with 100% B using a flow rate of 300  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Sample solution (20  $\mu\text{l}$ ) was injected and detection was performed with multiple reaction monitoring (MRM) in the negative ionization mode. The limit of detection was 10 nM for caffeine, and 100 nM for its metabolites (determined without biological matrix).

**Biochemical analysis.** Total protein extracts were obtained and analyzed as previously described (Leboucher *et al*, 2013). Briefly, tissues were homogenized in 200  $\mu\text{L}$  Tris buffer (pH 7.4) containing 10% sucrose and protease inhibitors (Complete; Roche Diagnostics GmbH), sonicated, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Protein amounts were evaluated using the BCA assay (Pierce), subsequently diluted with LDS 2X supplemented with reducing agents (Invitrogen) and then separated on NuPage Novex gels (Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were then saturated (5% non-fat dry milk or 5% BSA) in TNT (Tris 15mM pH8, NaCl 140mM, 0.05% Tween) and incubated with primary and secondary antibodies. Signals were visualized using chemiluminescence kits (ECL<sup>TM</sup>, Amersham Bioscience) and a LAS3000 imaging system (Fujifilm). Results were normalized to GAPDH and quantifications were performed using ImageJ software (Scion Software). All primary antibodies used are described in Table 1.

**mRNA extraction and quantitative real-time RT-PCR analysis.** Total RNA were extracted from hippocampi and purified using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, France). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Applied Biosystems High-Capacity cDNA reverse transcription kit. Quantitative real-time RT-PCR analysis was performed on an Applied Biosystems Prism 7900 System using Power SYBR Green PCR Master Mix. The thermal cycler conditions were as follows: hold for 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of a two-step PCR consisting of a 95°C step for 15 s followed by a 60°C step for 25 s. Sequences of primer used are given in Table 2. Cyclophilin A was used as internal control. Amplifications were carried out in triplicate and the relative expression of target genes was determined by the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method.

**Statistics.** Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences between mean values were determined using the Student's t-test, 2W-ANOVA or 1W-ANOVA followed by a post-hoc Fisher's LSD test using Graphpad Prism Software. P values  $<0.05$  were considered significant.

## Results

**Mouse monitoring and caffeine concentrations.** Animals were monitored all along the treatment, i.e. from 2 to 12 month of age. In our experimental conditions, we did neither encounter mortality nor signs of animal suffering in caffeine-treated animals. At completion of experiments, water-treated animals exhibited a body weight gain reaching  $136.8\pm 2.6\%$  of their initial body weight. Caffeine consumers exhibited a lower body weight gain reaching  $127.9\pm 1.3\%$  of initial body weight ( $p=0.002$  vs. water consumers), in line with previous observations (Duarte *et al*, 2012). Body temperature was found similar regardless of treatment and genotype (Water:  $35.4\pm 0.3^{\circ}\text{C}$  vs. Caffeine:  $34.9\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ; NS using Student's t-test). In average, consumption of caffeinated-water was  $3.99\pm 0.15$  mL/mouse/day corresponding to an averaged intake of 1.2 mg of caffeine per day. This achieved plasma and brain concentrations of about  $4\ \mu\text{M}$  of caffeine (Figure 1A) with a brain:plasma ratio being close to 1 (Figure 1B). Caffeine metabolites (paraxanthine, theobromine and theophylline) were also detected in the plasma and the brains of treated mice (Figure 1A). In the plasma, paraxanthine levels were similar to those of caffeine while theobromine and theophylline concentrations were significantly lower (Figure 1A). Brain levels and brain:plasma ratio were found significantly lower for all metabolites (Figures 1A-B).

**Caffeine prevents development of spatial memory impairments in THY-Tau22 mice.** In order to evaluate the impact of caffeine treatment towards the development of memory impairments in THY-Tau22 mice, we performed a Morris Water Maze test. As shown in Figure 2A, following path length calculations, we could not detect significant difference between groups during the learning phase using two-way ANOVA analysis ( $p=0.235$ ). Also, treatment did not influence animal velocity ( $p>0.05$  using One-Way ANOVA; Figure 2B).

Seventy-two hours following acquisition, a probe trial was performed. As observed in the learning phase, velocity and path were found similar between the different experimental groups ( $p > 0.05$ , not shown). Regardless of treatment, WT animals exhibited a significant preference for the target quadrant vs. non-target quadrants (Figure 2C) with a significantly greater proportion of time spent in the former than expected by chance (i.e.  $> 25\%$ ; WT Water:  $34.04 \pm 3.37\%$ ,  $p = 0.025$ ; WT Caffeine:  $33.87 \pm 3.66\%$ ,  $p = 0.031$ ). Caffeine did not impact performance of WT animals. Conversely, and as expected (Burnouf *et al*, 2013), THY-Tau22 mice treated with water exhibited major memory impairments with no preference for the target quadrant (Figure 2C). Notably, THY-Tau22 mice treated with caffeine exhibited improved memory performance as compared to non-treated THY-Tau22 animals manifested by a significant preference for the target quadrant vs. non-target area (Figure 2C). Also, these animals spent a significantly greater proportion of time in the former than expected by chance ( $32.30 \pm 2.22\%$ ,  $p = 0.0082$ ). Together, these data indicated that chronic caffeine intake prevents from the development of memory impairments in THY-Tau22 mice.

### **Caffeine reduces Tau phosphorylation and proteolytic fragments in THY-Tau22 mice.**

THY-Tau22 mice exhibit AD-like Tau hyperphosphorylation correlated with memory deficits (Burnouf *et al*, 2013). To address the potential impact of caffeine treatment on Tau, we evaluated its phosphorylation at several epitopes (Figure 3). Specifically, we determined Tau phosphorylation at Ser214, Ser396, Ser404 (physiological epitopes), Tau abnormal phosphorylation at Thr212/Ser214 (AT100) and Ser422 as well as Tau dephosphorylation using Tau1 antibody. Our data indicated that caffeine treatment in THY-Tau22 mice significantly reduced the levels of several Tau phospho-epitopes relatively to total Tau levels i.e. Ser396 ( $-22.6 \pm 7.0\%$  of THY-Tau22 water;  $p = 0.019$ ), Thr212/Ser214 ( $-20.3 \pm 4.8\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p = 0.038$ ) and Ser422 ( $-27.5 \pm 4.4\%$  of untreated THY-Tau22

mice;  $p=0.005$ ) (Figure 3). Accordingly, Tau1 labeling, representing some de-phosphorylated Tau epitopes, was found significantly increased in treated THY-Tau22 ( $+36.4\pm 7.4\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.005$ ). Finally, using antibodies recognizing Tau protein at either N- or C- terminal, we observed a significant increase of total Tau levels (N-ter:  $+29.0\pm 7.6\%$  of untreated THY-Tau22 mice,  $p=0.04$ ; C-Ter:  $+22.0\pm 5.3\%$  of water-treated THY-Tau22 mice;  $p=0.004$ ) concomitant with a significant reduction of respective Tau fragments in caffeinated THY-Tau22 mice vs. non-treated transgenic animals (N-ter fragments:  $-40.9\pm 5.2\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.027$ ; C-ter fragments:  $-54.8\pm 3.5\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.004$ ; molecular masses comprised between 25 and 35 kDa; Figure 3). This occurred while human Tau transgene mRNA expression remained unchanged (not shown). Together, these data indicated that caffeine mitigates both Tau hyperphosphorylation and level of proteolytic fragments in THY-Tau22 mice.

**Caffeine impacts on kinase/phosphatase balance in THY-Tau22 mice.** Tau phosphorylation is under the tight control of a kinase/phosphatase balance. More than 30 different kinases are able to phosphorylate Tau (Sergeant *et al*, 2008). In a first attempt, we thus evaluated impact of caffeine upon expression and activation of major Tau kinases, namely Akt, GSK3 $\beta$ , CaMKII, Erk, cdk5, p38 and AMPK. As shown on figure 4, caffeine treatment did not alter expression of the studied kinases in the hippocampus of THY-Tau22 mice. Phosphorylation of Akt, GSK3 $\beta$ , CaMKII, p38 and AMPK remained also unchanged (Figure 4). However, we observed that caffeine led to an increased Erk phosphorylation as compared to non-treated THY-Tau22 animals ( $+83.3\pm 23.8\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.01$ ). Further, cdk5 immunoreactivity was found significantly higher in caffeinated THY-Tau22 mice ( $+43.4\pm 12.3\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.042$ ), without any change in the level of its pathological activator p25. Changes in Erk phosphorylation and cdk5

expression failed to explain the decreased Tau phosphorylation induced by caffeine at several phosphoepitopes. Therefore, we next addressed expression of the catalytic subunit of PP2A, the main Tau phosphatase, and found that caffeine treatment led to a significant increase of PP2AC expression in the hippocampus of THY-Tau22 mice ( $+34.1 \pm 4.3\%$  of untreated THY-Tau22 mice;  $p=0.006$ ). Overall, our data suggested that reduced Tau phosphorylation by caffeine is likely linked to changes in phosphatase rather than kinases in THY-Tau22 mice.

**Caffeine reduces hippocampal neuro-inflammatory markers in THY-Tau22 mice.** THY-Tau22 mice as other Tau transgenic mouse models have shown to exhibit hippocampal neuroinflammation, progressing along the development of hippocampal Tau pathology and behavioral alterations (Schindowski *et al*, 2006; Belarbi *et al*, 2011; unpublished data). Of interest, on the one hand, neuroinflammation promotes Tau hyperphosphorylation (Kitazawa *et al*, 2005; Gorlovoy *et al*, 2009) and, on the other hand, caffeine has been suggested to mitigate neuroinflammatory processes (Brothers *et al*, 2010; reviewed by Chen and Chern, 2011). Finally, Tau fragments have been shown to promote brain inflammation by themselves (Zilka *et al*, 2009; Kovac *et al*, 2011). Together, these observations prompted us to investigate the effects of caffeine towards neuro-inflammatory markers previously found upregulated in Tau transgenic models (Schindowski *et al*, 2006; Garwood *et al*, 2010; Belarbi *et al*, 2011). Our data specifically indicate that markers of innate immunity (CD68, CD45, TLR2) and astrocytes (GFAP) as well as several pro-inflammatory cytokines (CCI4, CCI5 and TNF $\alpha$ ) were significantly upregulated in the hippocampus of THY-Tau22 as compared to WT animals (Figure 5). While caffeine had no effect in WT animals, mRNA levels of several markers (CD45, TLR2, CCI4, TNF $\alpha$ ) were significantly reduced in caffeine-treated THY-Tau22 mice as compared to untreated Tau animals. Therefore, our data indicate that caffeine reduces hippocampal neuro-inflammation in THY-Tau22 mice.

## Discussion

The present data demonstrate that chronic caffeine intake reduces hippocampal Tau hyperphosphorylation and the level of some Tau fragments, mitigates neuro-inflammation and prevents subsequent memory impairments in THY-Tau22 mice. This is the first description of caffeine effects in a transgenic mouse model of tauopathy.

Chronic delivery of caffeine at 0.3 g/L through drinking water was chosen according to previous data reporting significant benefit in a transgenic mouse model of amyloidogenesis (Arendash *et al*, 2009). According to our analyses, such regimen achieves moderate levels of caffeine (about 4  $\mu$ M) into plasma and brain of treated animals. These concentrations correspond, in Humans, to a moderate consumption of few cups of coffee per day; and among the possible pharmacological targets of caffeine, concentrations achieved are essentially compatible with the blockade of adenosine receptors (Fredholm *et al*, 1999). Plasma levels of caffeine observed here are close to the values previously obtained following a similar chronic oral treatment in another mouse strain (Georgiev *et al*, 1993) and the plasma:brain ratio close to 1 is in line with other experimental data (Kaplan *et al*, 1989). In addition to caffeine, we also evaluated its metabolites in brain. Brain measurements as well as brain:plasma ratio calculations showed significantly lower values for all caffeine metabolites as compared to caffeine itself, in accordance with data obtained following acute caffeine injections (Kaplan *et al*, 1989; Xu *et al*, 2010). Although caffeine is found at higher concentration than its metabolites, we cannot rule out their contribution to the beneficial effects observed as they exhibit pharmacological activity and were demonstrated to be neuroprotective in other neurodegenerative models (Fredholm *et al*, 1999; Xu *et al*, 2010). This point will deserve further future investigations.



Following Morris Water maze, we demonstrate that long-term caffeine intake significantly prevents from the development of memory deficits in Tau transgenic mice. Conversely to Tau mice, caffeine does not lead to improve learning and memory of WT mice in our Morris Water Maze paradigm supporting that caffeine may act as a cognitive normalizer. Also, absence of path or velocity differences in caffeine-treated animals during learning and probe trials -indicative of a tolerance following long-term treatment (Fredholm *et al.*, 1999)- rule-out that, in caffeine-treated animals, memory benefit (but also pathology changes) arises from an exercise-like behavior (Belarbi *et al.*, 2011). Our behavioural observations are in accordance with the ability of this methylxanthine to improve cognitive performances in various detrimental conditions associated with memory deficits (for review see Marques *et al.*, 2011) as aging (Vila-Luna *et al.*, 2012), diabetes (Duarte *et al.*, 2012) or amyloid toxicity/amyloidogenesis (Arendash *et al.*, 2009; Dall'Igna *et al.*, 2007). This raises the possibility that in all these detrimental situations, caffeine shares similar mechanisms to favour cognitive function, for instance, by reinforcing synaptic plasticity (Simons *et al.*, 2011; Alzoubi *et al.*, 2013) or inhibiting acetylcholinesterase (Pohanka and Dobes, 2013). However, caffeine could also exert specific effects regarding the particular detrimental processes involved in each case. For instance, caffeine seems to modulate secretases in APP models, contributing to reduced amyloid load (Arendash *et al.*, 2009). In THY-Tau22 mice, our data suggest that memory improvement is ascribed, at least in part, to changes in Tau hyperphosphorylation, Tau truncation and hippocampal neuroinflammation.

Tau hyperphosphorylation has been consistently associated with cognitive alterations in several dementing disorders (Sergeant *et al.*, 2008) and Tau transgenic models (Burnouf *et al.*, 2013). In line, increased Tau phosphorylation has been associated with impaired spatial memory in wild-type or Tau transgenic animals (Le Freche *et al.*, 2012; Leboucher *et al.*,

2013). Reduced Tau hyperphosphorylation in caffeine-treated THY-Tau22 mice, notably at pathological epitopes (AT100, Ser422), may likely explain improved memory performances. Tau phosphorylation is under the control of phosphatases, essentially PP2A, and a number of distinct kinases (>30; Sergeant *et al*, 2008). None of the studied kinases was found altered following caffeine treatment. This is at odds with previous reports indicating that low doses of caffeine reduces Y216 phosphorylation of GSK3 $\beta$ , both in vitro and in vivo (Arendash *et al*, 2009; Prasanthi *et al*, 2010). Rather, we observed that caffeine treatment increased both Erk phosphorylation and cdk5 expression. Erk activation was previously shown to occur in APP mice following a similar caffeine treatment paradigm (Zeitlin *et al*, 2011). Erk and cdk5 are well-known Tau kinases (Sergeant *et al*, 2008) but, here, their changes seem thus unlikely related to the decreased Tau phosphorylation we observed in caffeine-treated THY-Tau22 mice. However, both Erk and cdk5 have also been described to be important for spatial memory and synaptic plasticity (Giovannini, 2006; Guan *et al*, 2011; Lai *et al*, 2012), in accordance with behavioural improvement of Tau mice observed following caffeine treatment. Rather than involving kinases, reduced Tau phosphorylation could be ascribed to change in phosphatase level. Indeed, Tau mice treated with caffeine exhibit a significant increase in the expression of the catalytic subunit of PP2A, the main brain Tau phosphatase (Liu *et al*, 2005). PP2A activation by selenate is known to mitigate Tau hyperphosphorylation and restore memory function in Tau transgenic models (Corcoran *et al*, 2010; van Eersel *et al*, 2010). This view is also in accordance with various works conversely demonstrating association of Tau hyperphosphorylation with reduced PP2A following anesthesia treatment or in diabetic models (Planel *et al*, 2007; Planel *et al*, 2009; Papon *et al*, 2013). The latter studies notably support that PP2A changes are ascribed to hypothermia. Our data indicate that body temperature remains unaffected regardless of genotype and treatment, ruling out that body temperature changes may underly the changes we observed. Alternatively, it remains

possible that PP2A regulation by caffeine arises from the modulation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors, non-selectively blocked by caffeine (Fredholm *et al*, 1999; Müller and Jacobson, 2011). Indeed, previous findings demonstrated that PP2A activity is decreased following A<sub>2A</sub> receptor activation in murine heart (Tikh *et al*, 2008). However, precise caffeine impacts on PP2A remains to be fully elucidated.

In Tauopathies, besides phosphorylation, Tau protein undergoes other post-translational modifications such as truncation. Numerous truncated Tau fragments with various molecular masses have been described in the brain of AD patients but so far only few fragments have been identified (for review see Kovacech and Novak, 2010). Previous works showed that truncated Tau species are able to drive abnormal microtubule assembly, to promote Tau phosphorylation and to favour the development of neurofibrillary degeneration in the rat brain (Zilka *et al*, 2012 for review). Tau fragments thus exert a detrimental role in AD. Interestingly, in addition to a reduced Tau hyperphosphorylation, we demonstrate that caffeine treatment leads to a significant reduction of some Tau fragments. Given the apparent molecular mass of the latter and Tau sequence targeted by antibodies used (the first 19AA and the last 15AA by N-ter and C-ter total Tau antibodies, respectively), modulated fragments are unlikely related to the two well-characterized species Glu391 and Asp421 (Novak *et al*, 1993; Rissman *et al*, 2004). Further investigations are thus required to identify their precise sequence, their proteolytic cleavage sites and their specific role in Tau pathology. Nonetheless, Tau fragments are known to promote neuroinflammation and cause the release of proinflammatory cytokines (Zilka *et al*, 2009; Kovac *et al*, 2011). Accordingly, THY-Tau22 mice exhibit a significant hippocampal upregulation of several markers of innate immunity. The reduced Tau fragments observed in caffeine-treated THY-Tau22 mice correlates with the significant decrease of several pro-inflammatory markers. Activation of microglia and pro-inflammatory cytokines has been shown to themselves promote Tau hyperphosphorylation

both in vitro and in vivo (Kitazawa *et al*, 2005; Gorlovoy *et al*, 2009). Therefore, it remains possible that modification of Tau truncation by caffeine indirectly contributes to the decreased Tau phosphorylation observed by mitigating neuro-inflammatory processes. Alternatively or in addition, reduced neuro-inflammation may arise from a direct pharmacological effect of caffeine on inflammatory cells. Indeed, caffeine has been previously shown to protect from LPS-induced neuroinflammation (Brothers *et al*, 2010). This effect could be mediated through A<sub>2A</sub> receptors, expressed by brain inflammatory cells and whose blockade has been consistently found to reduce neuro-inflammatory processes in various models of neurodegeneration (Wei *et al*, 2011 and references herein).

In conclusion, our data demonstrate that chronic caffeine intake reduces the level of Tau phosphorylation/truncation, neuroinflammation and improves memory in a Tau transgenic mouse model. Considering benefits afforded by moderate caffeine intake in Tau (this study) and amyloid models (Arendash *et al*, 2009; Dall'Igna *et al*, 2007; see Blum *et al*, 2013 for review) as well as the safety profile of this methylxanthine in Humans (Fredholm *et al*, 1999; Postuma *et al*, 2012), caffeine could be considered as a relevant therapeutic candidate in early AD patients.

**Funding and disclosure.** We declare no competing financial interests in relation to the work described.

**Acknowledgments.** This work was supported by grants from France Alzheimer (to DB) and LECMA/Alzheimer Forschung Initiative (to DB and CM). Our laboratory is also supported by the LabEx (excellence laboratory) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to ALZheimer's disease), Inserm, CNRS, Université Lille 2, Région Nord/Pas-de-Calais, DN2M, ANR (ADORATAU) and FUI MEDIALZ. The authors

thank the animal facility of IMPRT-IFR114 and M. Besegher, I. Brion, D. Cappe, R. Dehaynin, J. Devassine, Y. Lepage, C. Meunier and D. Taillieu for transgenic mouse production and animal care. CL and AL hold a doctoral grant from Lille 2 University. DB is an Inserm investigator.

## References

- Alzoubi KH, Srivareerat M, Aleisa AM, Alkadhi KA (2013). Chronic caffeine treatment prevents stress-induced LTP impairment: the critical role of phosphorylated CaMKII and BDNF. *J. Mol. Neurosci.* **49**: 11-20.
- Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A *et al* (2009). Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J. Alzheimer Dis.* **17**: 661-80.
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M *et al* (2011). Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* **42**: 486-94.
- Blum D, Sandau U, Laurent C, Batalha V, Leboucher A, Hamdane M *et al* (2013). Adenosine Receptors and Alzheimer's Disease in Masino S., Boison, D., (Eds.), Adenosine: A key link between metabolism and brain activity Springer New York, pp. 385-408.
- Brothers HM, Marchalant Y, Wenk GL (2010). Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Neurosci. Lett.* **48**: 97-100.
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**: 960-9.
- Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A *et al* (2013). NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell* **12**: 11-23.
- Cao C, Loewenstein DA, Lin X, Zhang C, Wang L, Duara R *et al* (2012). High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J. Alzheimers Dis.* **30**: 559-72.
- Chen JF, Chern Y (2011). Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: human and experimental studies. *Handb. Exp. Pharmacol.* **200**: 267-310.
- Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen T, Nheu L *et al* (2010). Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J. Clin. Neurosci.* **17**: 1025-33.
- Dall'Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 1207-9.
- Dall'Igna, OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007). Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol.* **203**: 241-5.
- Duarte JM, Agostinho PM, Carvalho RA, Cunha RA, (2012). Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of

NONcZNO10/LTJ mice. *PLoS One* **7**: e21899.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE, (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **51**: 83-133.

Garwood CJ, Cooper JD, Hanger DP, Noble W (2010). Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Front. Psychiatry* **12**: 136.

Georgiev V, Johansson B, Fredholm BB (1993). Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Research* **612**: 271-77.

Giovannini MG (2006). The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev. Neurosci.* **17**: 619-34.

Gorlovoy P, Larionov S, Pham TT, Neumann H (2009). Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *FASEB J.* **23**: 2502-13.

Guan JS, Su SC, Gao J, Joseph N, Xie Z, Zhou Y (2011). Cdk5 is required for memory function and hippocampal plasticity via the cAMP signaling pathway. *PLoS One* **6**: e25735.

Kaplan GB, Greenblatt DJ, Leduc BW, Thompson ML, Shader RI (1989). Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**: 1078-83.

Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005). Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **25**: 8843-53.

Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M., Novak, M., 2011. Misfolded truncated protein  $\tau$  induces innate immune response via MAPK pathway. *J. Immunol.* **187**, 2732-9

Kovacech, B., Novak, M., 2010. Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 708-16.

Lai, K.O., Wong, A.S., Cheung, M.C, Xu, P., Liang, Z., Lok, K.C., Xie, H., Palko, M.E., Yung, W.H., Tessarollo, L., Cheung, Z.H., Ip, N.Y., 2012. TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat. Neurosci.* **15**, 1506-15.

Le Freche, H., Brouillette, J., Fernandez-Gomez, F.J., Patin, P., Caillierez, R., Zommer, N., Sergeant, N., Buée-Scherrer, V., Lebuffe, G., Blum, D., Buée L., 2012. Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative cognitive impairment. *Anesthesiology* **116**, 779-87.

Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., Bantubungi, K., Breton, C., Pigny, P., Buée-Scherrer, V., Staels, B., Hamdane, M., Tailleux, A., Buée, L., Blum, D., 2013. Detrimental effects of diet-induced obesity on  $\tau$  pathology are independent of insulin resistance in  $\tau$  transgenic mice. *Diabetes* **62**, 1681-8.

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.X., 2005. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 1942-50.

Lublin, A., Isoda, F., Patel, H., Yen, K., Nguyen, L., Hajje, D., Schwartz, M., Mobbs, C., 2011. FDA-approved drugs that protect mammalian neurons from glucose toxicity slow aging dependent on cbp and protect against proteotoxicity. *PLoS One.* **6**, e27762.

Marques, S., Batalha, V.L., Lopes, L.V., Outeiro, T.F., 2011. Modulating Alzheimer's disease through caffeine: a putative link to epigenetics. *J. Alzheimer Dis.* **24**, Suppl 2, 161-71.

Müller C.E., Jacobson K.A., 2011. Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* **200**, 151-99.

Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M., 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J.* 12,365-70.

Papon, M.A., El Khoury, N.B., Marcouiller, F., Julien, C., Morin, F., Bretteville, A., Petry, F.R., Gaudreau, S., Amrani, A., Mathews, P.M., Hébert, S.S., Planel, E., 2013. Deregulation of protein phosphatase 2A and hyperphosphorylation of  $\tau$  protein following onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 62, 609-17.

Planel, E., Richter, K.E., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J.B., Nelson, R.B., Lau, L.F., Duff, K.E., 2007. Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J. Neurosci.* 27, 3090-7.

Planel, E., Bretteville, A., Liu, L., Virag, L., Du, A.L., Yu, W.H., Dickson, D.W., Whittington, R.A., Duff, K.E., 2009. Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J.* 23, 2595-604.

Pohanka, M., Dobes, P., 2013. Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9873-82.

Postuma, R.B., Lang, A.E., Munhoz, R.P., Charland, K., Pelletier, A., Moscovich, M., Filla, L., Zanatta, D., Rios Romenets, S., Altman, R., Chuang, R., Shah, B., 2012. Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 79, 651-8.

Prasanthi, J.R., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J.D., Ghribi, O., 2010. Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1212-20.

Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M.P., LaFerla, F.M., Rohn, T.T., Cotman, C.W., 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest.* 114,121-30.

Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.P., Hamdane, M., Buée, L., 2006. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *AM. J. Pathol.* 169, 599-616.

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

Simons, S.B., Caruana, D.A., Zhao, M., Dudek, S.M., 2011. Caffeine-induced synaptic potentiation in hippocampal CA2 neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 23-5.

Tikh, E.I., Fenton, R.A., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Dobson, J.G.Jr., 2008. Adenosine A1 and A2A receptor regulation of protein phosphatase 2A in the murine heart. *J. Cell. Physiol.* 216, 83-90.

Van der Jeugd, A., Vermarcke, B., Blum, D., Derisbourg, M., Hamdane, M., Buee, L., Op de Beeck, H., D'Hooge R., 2013. Progressive age-related cognitive decline in Tau mice. *Journal of Alzheimer Disease* (in press).

Van Eersel, J., Ke, Y.D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J.J., Götz, J., Ittner, L.M., 2010. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 13888-93.

Vila-Luna, S., Cabrera-Isidoro, S., Vila-Luna, L., Juárez-Díaz, I., Bata-García, J.L., Alvarez-Cervera, F.J., Zapata-Vázquez, R.E., Arankowsky-Sandoval, G., Heredia-López, F., Flores, G., Góngora-Alfaro, J.L., 2012. Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience* 202, 384-95.

- Wei, C.J., Li, W., Chen, J.F., 2011. Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system by genetic knockout studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1358-1379.
- Xu, K., Xu, Y.H., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., 2010. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 167, 475-81.
- Zeitlin, R., Patel, S., Burgess, S., Arendash, G.W., Echeverria, V., 2011. Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain Res.* 1417,127-36.
- Zilka, N., Stozicka, Z., Kovac, A., Pilipcinec, E., Bugos, O., Novak, M., 2009. Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. *J.Neuroimmunol.* 209, 16-25.
- Zilka, N., Kovacech, B., Barath, P., Kontsekova, E., Novák, M., 2012. The self-perpetuating tau truncation circle. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 681-6.



## Figure legends

**Figure 1. Concentrations of caffeine and its metabolites in plasma and brains of chronically-treated animals.** **A.** Plasma and brain concentrations of caffeine and its metabolites (paraxanthine, theobromine and theophylline) assessed using LC/MS. Caffeine is the main component found in the brain. **B.** Brain:plasma ratio calculated from data given in A. Ratio is close to 1 for caffeine and is significantly lower for metabolites. Results represent pooled data from WT and Tau mice and are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Caffeine using 1W-ANOVA.  $n = 10$ /group.

**Figure 2. Caffeine prevents development of spatial memory impairments in THY-Tau22 mice.** **A.** Learning phase of the Morris Water Maze task. No difference is observed between groups during the learning phase using path length calculations. **B.** Velocity is not modified regardless of group. **C.** Probe test performed 72h after the last day of learning. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of the averaged percent of total time spent in target quadrant (T) vs non-target quadrants (NT). Data demonstrate that WT animals exhibit a significantly preference for target quadrant while THY-Tau22 mice treated with water did not. THY-Tau22 mice treated with caffeine significantly exhibit a preference for target quadrant as observed for WT animals. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs. Target, using Student's t-test; # $p < 0.05$  vs. WT H<sub>2</sub>O using 1W-ANOVA and post-hoc Fisher's LSD.  $n = 10-15$ /group.

**Figure 3. Caffeine reduces Tau phosphorylation and Tau fragments in THY-Tau22 mice.** **A.** Western blot analysis of Tau phosphorylation in THY-Tau22 mice treated with water or caffeine using antibodies targeting physiological (pSer214, pSer396, pSer404) and pathological (pThr212/Ser214, pSer422) Tau epitopes. We observe a significant decrease of

phosphorylation of Thr212/Ser214, Ser396 and Ser422 epitopes as well as an increase of dephosphorylated Tau using Tau1 antibody. Moreover, caffeine reduces Tau fragments (f-Cter and f-Nter) concomitantly with an increased Total Tau levels (Cter and Nter). **B.** Quantifications were performed over total tau levels (Cter). Total Tau levels were quantified vs. GAPDH, used as loading control. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. THY-Tau22 H<sub>2</sub>O vs THY-Tau22 caffeine : \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , using Student's t-test. n=5-7/group.

**Figure 4. Impact of caffeine on hippocampal Tau kinases and PP2AC.** Western blot analysis was performed using antibodies raised against total/phosphorylated forms of several Tau kinases and PP2AC. Results indicate increased pErk and cdk5 in caffeine-treated animals together with an upregulation of PP2AC. Phospho-epitopes were quantified vs. total form of respective protein. Total expressions were quantified vs. GAPDH. Results are expressed as means percentage  $\pm$  SEM of untreated animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. non-treated animals, using Student t-test. n=5-7/group.

**Figure 5. Caffeine reduces hippocampal neuro-inflammation in THY-Tau22 mice.** qPCR analysis of hippocampal neuro-inflammatory markers. CD68, CD45 and TLR2 are innate immunity markers, GFAP is a marker for astrocytes; CCL4, CCL5 and TNF $\alpha$  are cytokines. All markers display increased levels in water-treated THY-Tau22 mice compared to WT animals. Caffeine treatment significantly reduced levels of CD45, TLR2, CCL4 and TNF $\alpha$  in THY-Tau22 mice. Results are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$  vs. WT H<sub>2</sub>O; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs. THY-Tau22 H<sub>2</sub>O using 1W-ANOVA and post-hoc Fisher's LSD. n=6-10/group.

**Table 1 :** Antibodies used in this study. MAPT, microtubule-associated protein tau ; PHF, paired-helical filaments ; Mono, monoclonal; Poly, polyclonal; WB, dilution used in Western blotting.

Name	Abbreviation	Epitope	Type	Origin	Provider	WB
<b>Tau</b>						
Anti-phospho-MAPT (pSer214)	PS214	pS214	Poly	Rabbit	Sigma	1/1000
Anti-PHF, clone AT100	AT100	pT212, pS214	Mono	Mouse	Thermo Scientific	1/1000
Anti-phospho-MAPT (pSer396)	PS396	pS396	Poly	Rabbit	Invitrogen	1/10000
Anti-phospho-MAPT (pSer404)	PS404	pS404	Poly	Rabbit	Invitrogen	1/10000
Anti-phospho-MAPT (pSer422)	PS422	pS422	Poly	Rabbit	Invitrogen	1/2000
Anti-Tau-1, clone PC1C6	Tau1	Non-phospho-S195,198, 199, 202	Mono	Mouse	Millipore	1/2000
Anti-total Tau	Cter	Cter last 15 aa of COOH terminus	Poly	Rabbit	Home-made	1/2000
Anti-total Tau	Nter	Nter first 19 aa of the amino-terminal region	Poly	Rabbit	Home-made	1/2000
<b>Others</b>						
Phospho-Akt (Ser473)	P-AKT	pS473	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
Akt	Akt	Mouse Akt COOH terminus	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
p-CAMKII (Thr286)	P-CAMKII	pT286	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
CAMKII	CAMKII	Human CAMKII amino- terminal region	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
CDK5 (C-8)	CDK5	CDK5 COOH terminus	Poly	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	P-ERK	pT202, pY204	Mono	Mouse	Cell Signaling Technology	1/1000
p44/42 MAPK (Erk 1/2) (3A7)	ERK	Mouse Erk 1/2	Mono	Mouse	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-GSK-3 $\beta$ (Ser9)	P-GSK3 $\beta$ (S9)	pS9	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-GSK3 (Tyr279/Tyr216) clone 5G-2F	P-GSK3 $\beta$ (Y216)	pY279/Y216	Mono	Mouse	Millipore	1/1000
GSK-3 $\alpha/\beta$ (0011-A)	GSK3	Mouse GSK3 $\beta$ 1-420	Mono	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	1/2000
Phospho- AMPK $\alpha$ (Thr172)	P-AMPK	pT172	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
AMPK $\alpha$	AMPK	Human AMPK $\alpha$ amino- terminal region	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
P35 (C-19)	P35	Human P35 COOH terminus	Poly	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	P-P38	pT180/pT182	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
P38 MAPK	P38	Human p38	Poly	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000
Anti-PP2A, C subunit, clone 1D6	PP2A C	Human PP2A C subunit 295-309	Mono	Mouse	Millipore	1/2000
GAPDH	GAPDH	Human GAPDH FL 1-335	Poly	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1/10000

**Table 2** : Primers sequence used in this study. FW, Forward ; R, Reverse

Name	Access Number	Primer FW	Primer R	Amplicon size
CD68	NM_009853.1	gacctacatcagagcccagat	cgccatgaatgtccactg	95
CD45	NM_001111316.2	gaggtgtctgatggtgcaag	tgtattccactaaagcctgatgaa	69
GFAP	NM_001131020.1	cgcgaacaggaagagcgcca	gtggcgggccatctctctct	104
TLR2	NM_011905.3	ggggcttcacttctctgctt	agcatcctctgagattgacg	110
CCL3	NM_011337.2	tgcccttgctgttctctct	gtggaatctccggctgtag	112
CCL4	NM_013652.2	gccctctctctctcttgct	gagggtcagagcccattg	72
CCL5	NM_013653.3	ctcactgcagccgcctctg	ccgagccatattggtgaggcagg	51
TNFa	NM_013693.2	tgcctatgtctcagcctctc	gaggccattgggaactct	116
Cyclophilin	NM_008907.1	agcatacaggtctctggcatc	ttaccttcccaaagaccac	126

Figure 1

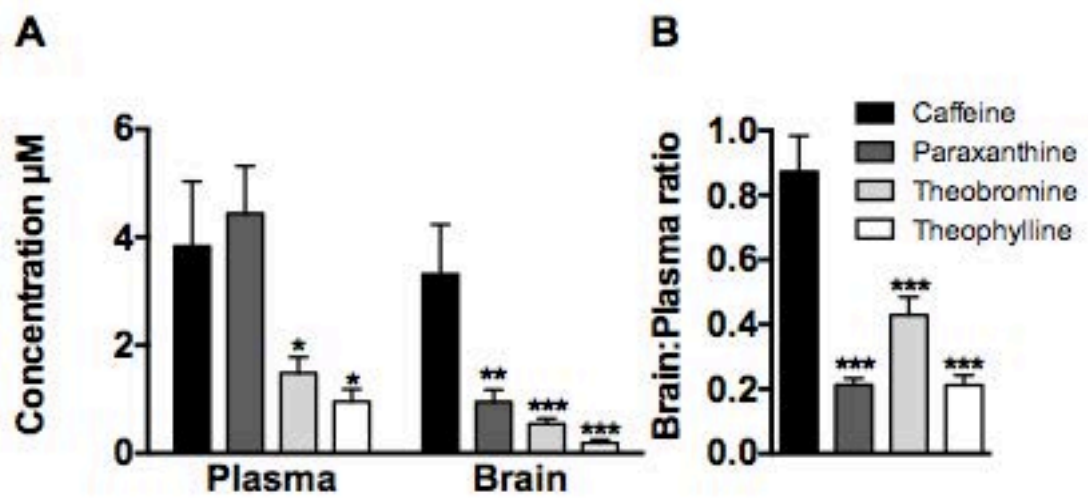


Figure 2

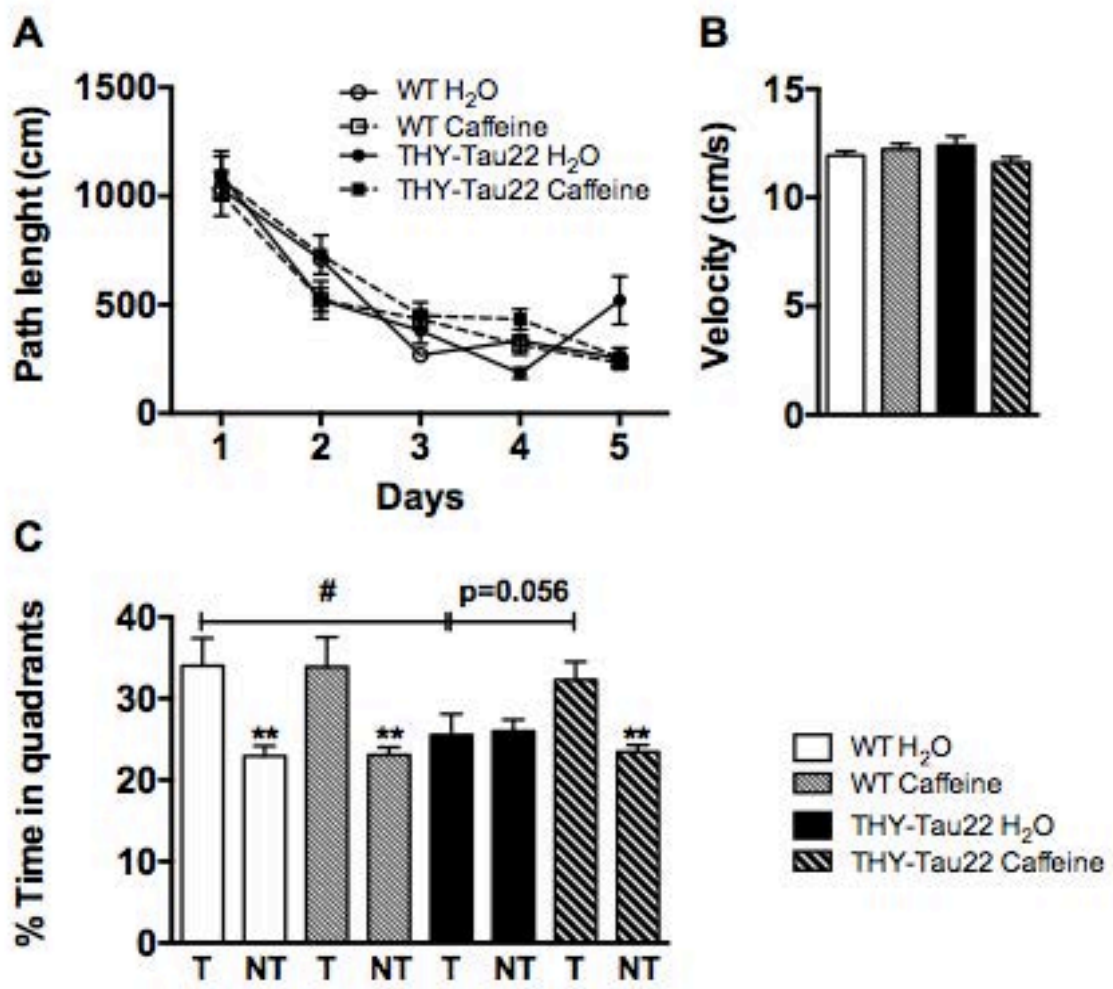


Figure 3

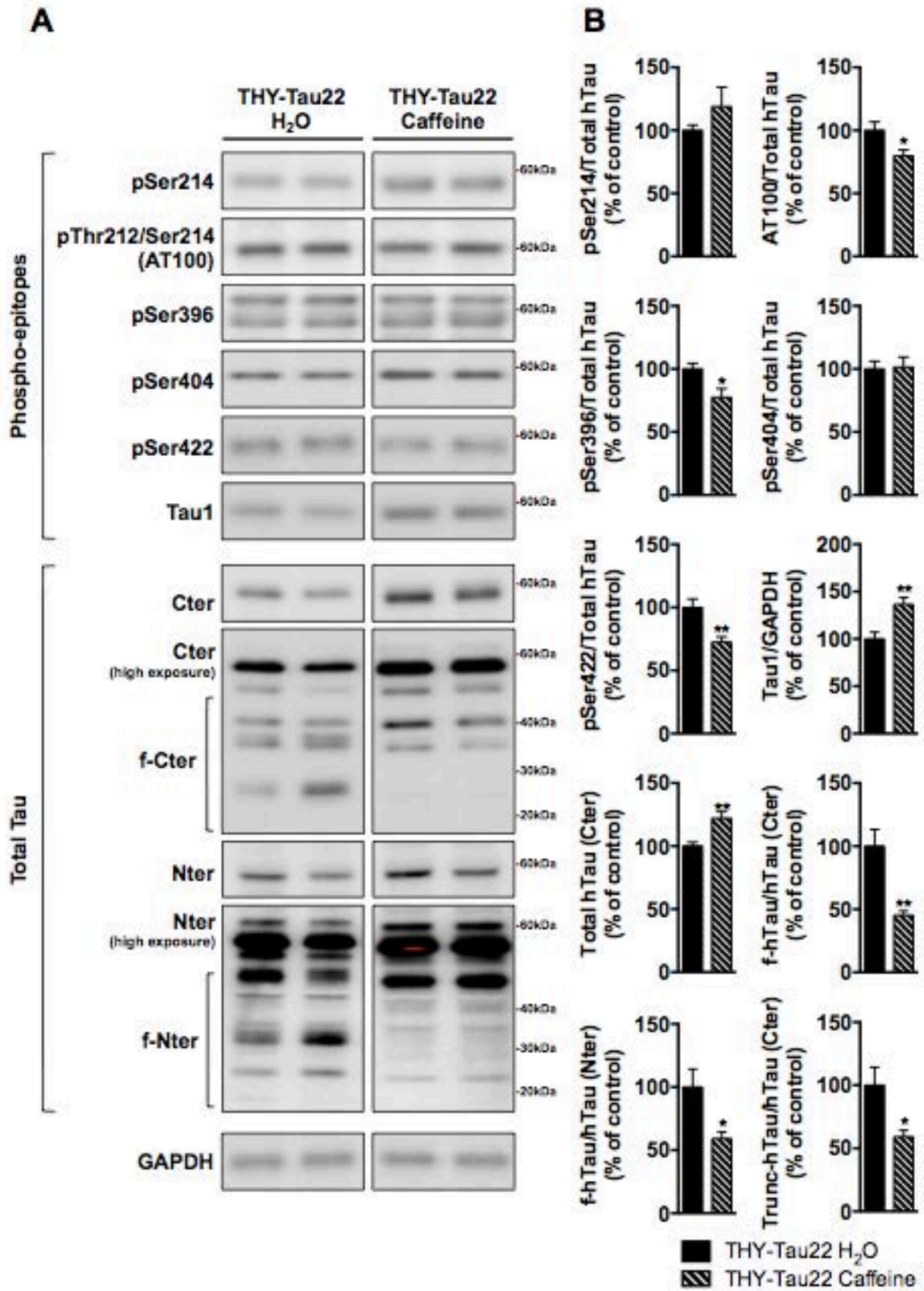


Figure 4

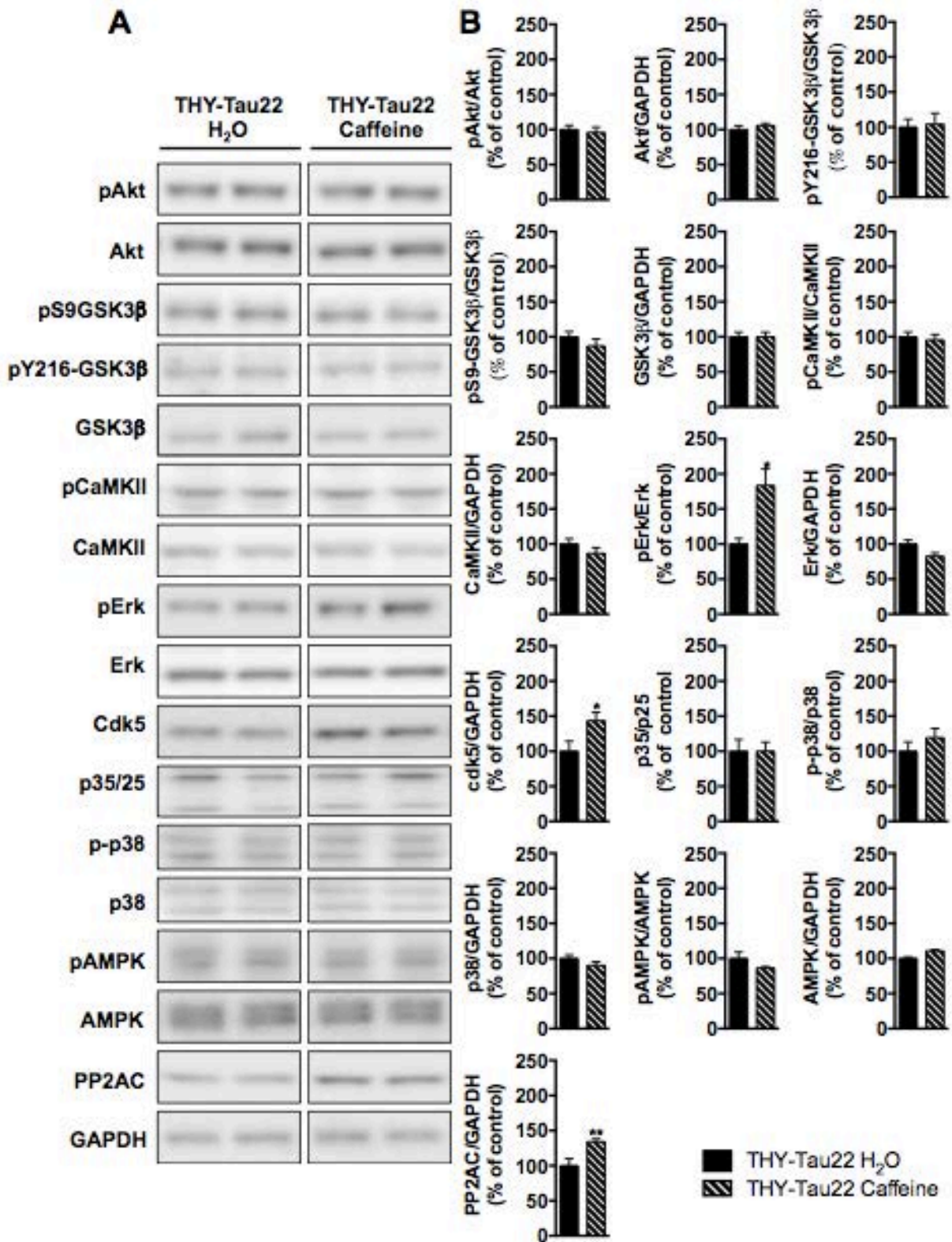
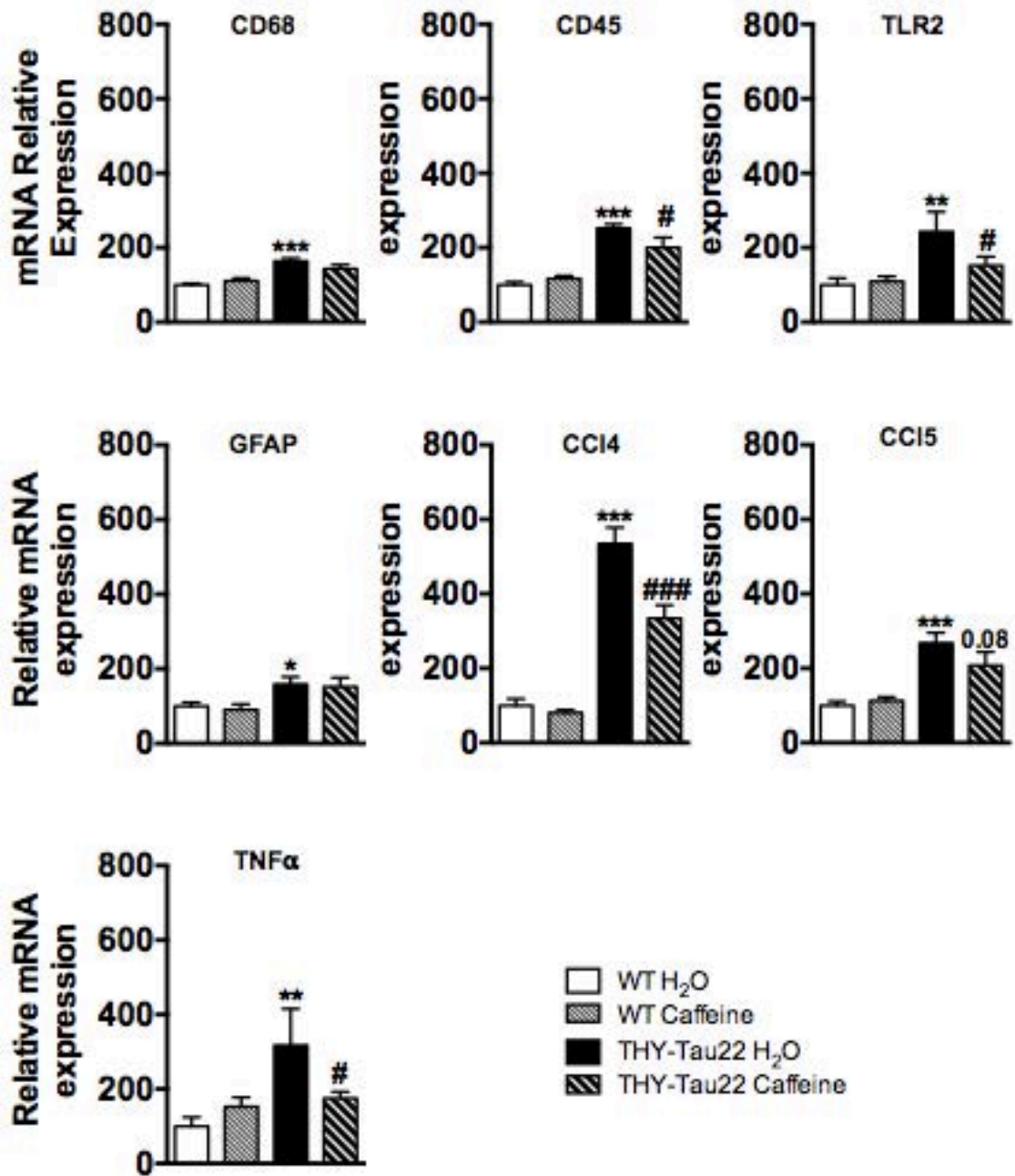




Figure 5



## Conclusion

Les résultats présentés au cours de cette étude démontrent pour la première fois qu'un traitement chronique de caféine réduit l'hyperphosphorylation et la formation d'espèces tronquées de tau, module la réponse neuro-inflammatoire et prévient les déficits mnésiques dans le modèle de tauopathie THY-Tau22.

L'administration de la caféine à une concentration de 300mg/L conduit à une concentration centrale et plasmatique de l'ordre de 4 $\mu$ M. Ces concentrations suggèrent alors que les effets bénéfiques de la caféine observés soient uniquement médiés par le blocage des récepteurs adénoenergiques (Fredholm et al., 1999). Par ailleurs, nous ne pouvons exclure que ces effets soient également attribuables à ses métabolites (paraxanthine, théophilline et théobromine) retrouvés dans le cerveau, bien qu'à des concentrations plus faible que la caféine (Fredholm et al., 1999 ; Xu et al., 2010).

Les résultats observés au test de la piscine de Morris révèlent une prévention des altérations de mémoires spatiales par la caféine chez les souris THY-Tau22. Ces observations sont en accord avec les différentes études réalisées démontrant une réduction des déficits cognitifs par la caféine au cours de situations marquées par une perte mnésique tel que le vieillissement, le diabète ou encore suite à l'injection aigüe de peptide A $\beta$  (pour revue Cunha et Agostinho, 2010). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette normalisation sont probablement différents et dépendant du contexte physiopathologique. Concernant notre modèle THY-Tau22, cette prévention des déficits cognitifs semble induite par une réduction de l'hyperphosphorylation et de la troncation de la protéine tau ainsi qu'une modulation de la réponse neuro-inflammatoire.

L'hyperphosphorylation de tau est en effet associée au développement d'altérations cognitives dans différents modèles de pathologie tau (Polydoro et al., 2009 ; Van der Jeugd et al., 2011 ; Mustroph et al., 2012). De plus, nous avons précédemment observé dans le modèle THY-Tau22 une corrélation entre l'augmentation des altérations de mémoire spatiale et de l'hyperphosphorylation de tau (Le frêche et al., 2012 ; Leboucher et al., 2013). La réduction des niveaux de phosphorylation de tau aux épitopes AT100 et Ser422 peut donc participer à l'amélioration des performances mnésiques observées chez les souris THY-tau22 traitées à la caféine. Nous avons par ailleurs mis en évidence une réduction de la formation d'espèces tronquées de tau. Or, il a été démontré que ces espèces toxiques peuvent participer à l'agrégation et le développement de la pathologie tau (pour revue Chesser et al., 2013) ainsi qu'à la mise en place d'une réponse neuro-inflammatoire (Zilka et al., 2009). De plus, la

caféine module l'activation microgliale induite par l'administration de LPS (Brothers et al., 2010). Enfin, compte tenu des effets délétères de la neuro-inflammation sur les fonctions cognitives (Jacewicz et al., 2009 ; Kohman et al., 2013), et sur la pathologie tau (Gorlovoy et al., 2009 ; Bhaskar et al., 2010), la réduction de la réponse neuro-inflammatoire induite par tau chez les souris THY-Tau22 traitées chroniquement à la caféine peut jouer un rôle central sur les effets bénéfiques observés.

Etant donné l'innocuité et l'absence d'effets secondaires induit par une consommation chronique et habituelle de caféine (Fredholm et al., 1999), ses effets bénéfiques observés dans notre modèle de pathologie tau THY-Tau22 et dans des modèles amyloïdes (Arendash et al., 2006 ; Arendash et al., 2009 ; Dall'Igna et al., 2007), la caféine pourrait être considéré comme un agent thérapeutique pertinent chez les MCI. Des études complémentaires sont en effet nécessaires pour évaluer le potentiel thérapeutique de la caféine d'un point de vue curatif.



Conséquences de l'invalidation génétique  
des récepteurs A2A dans le modèle  
THY-Tau22



# Conséquences de l'invalidation génétique des récepteurs A<sub>2A</sub> dans le modèle THY-Tau22

## Objectifs

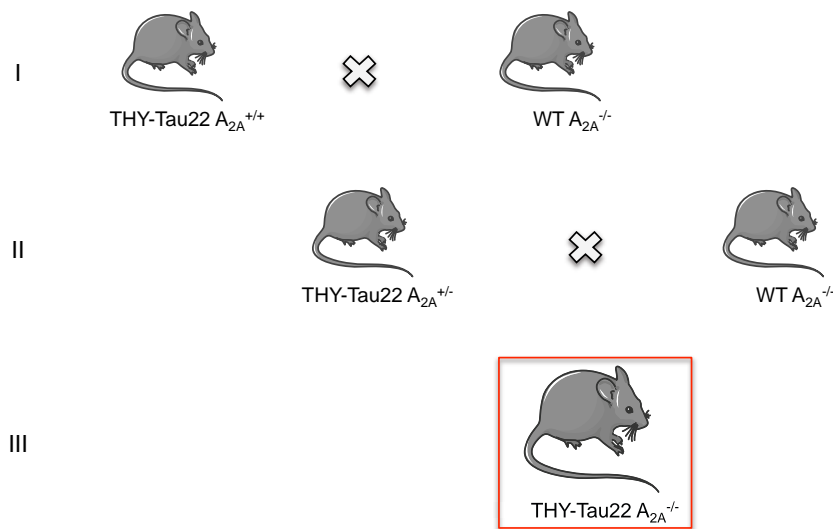
Les récepteurs adénosinergique A<sub>2A</sub> sont, avec les récepteurs A<sub>1</sub>, la principale cible pharmacologique de la caféine pour des consommations habituelles (Fredholm et al., 1999). Bien que leur blocage ait été observé comme bénéfique dans différentes situations neuropathologiques comme l'ischémie, la maladie de Parkinson, ou encore l'épilepsie (pour revue Gomes et al., 2011), leur modulation dans la MA reste à ce jour mal connue. L'activation des récepteurs A<sub>1</sub> a néanmoins été observée in vitro comme pouvant participer à la phosphorylation de tau, ce qui pourrait en faire une cible pharmacologique intéressante. Toutefois, les conséquences délétères observées en périphérie à la suite du blocage de ces récepteurs, principalement une élévation de la pression artérielle (Brown et al., 2006 ; Russell et al., 2006), les rendent inadéquat en tant que cible thérapeutique. A l'inverse, l'utilisation d'antagonistes A<sub>2A</sub> ne présente pas d'effets secondaires notables et certains comme l'Istradefylline (KW-6002) font actuellement l'objet d'essai clinique notamment dans la maladie de Parkinson (Mizuno et Kondo, 2013). Dans le contexte de la MA, le blocage génétique et pharmacologique de ces récepteurs A<sub>2A</sub> est associé à une réduction de la neurotoxicité et des déficits mnésiques induits par l'injection aigüe d'A $\beta$  (Dall'Igna et al., 2007 ; Canas et al., 2009), mais n'a pas été évalué dans des modèles chroniques de pathologie amyloïde. De la même manière, ses relations vis à vis de la pathologie tau sont à ce jour inconnues. **L'objectif de ce travail de thèse fut donc de déterminer les conséquences de l'invalidation des récepteurs A<sub>2A</sub> dans le modèle de tauopathie THY-Tau22.** Les effets sur la pathologie tau mais également sur les altérations comportementales, électrophysiologiques, de même que sur la réponse neuro-inflammatoire seront étudiés.

## Matériel et méthode

Des procédures expérimentales communes à la partie précédente (stabulation des animaux, piscine de Morris, sacrifice, analyses biochimiques et transcriptionnelles) ont déjà été détaillées dans l'article Laurent et al., (soumis). Pour ces raisons, seules les expérimentations spécifiques à cette partie feront l'objet d'une description complète.

### Génération des souris THY-Tau22 $A_{2A}^{-/-}$

Les souris THY-Tau22 invalidées génétiquement pour le récepteur  $A_{2A}$  et leurs contrôles de portée ont été obtenues par deux croisements successifs comme décrit dans la figure 41. L'ensemble des expérimentations a été effectué à l'âge de 6 mois.



**Figure 41** Les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  ont été obtenues par deux croisements successifs. Les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  et WT  $A_{2A}^{-/-}$  (généreusement données par Dr C. Ledent) ont été croisées pour obtenir des souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/-}$ . Ces dernières ont alors à nouveau été croisées avec les souris WT  $A_{2A}^{-/-}$  afin d'obtenir les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  et leur contrôle de portée.

## Etudes comportementales

### Labyrinthe en Y

La mémoire spatiale des souris (dépendante de l'hippocampe) a été évaluée par le test du labyrinthe en Y (Y-Maze). Les bras du labyrinthe font 20cm de long, 6,5cm de large et sont profonds de 15cm. La surface du labyrinthe est recouverte de sciure qui est mélangée après



chaque essai afin d'éliminer les indices olfactifs. Des indices extérieurs sont placés sur les murs entourant le labyrinthe. La lumière de la pièce est maintenue à 8 lux. Durant la phase d'exploration, les souris sont assignées à 2 bras (bras de départ/start et l'autre bras/other) qu'elles peuvent visiter librement pendant 5 minutes, sans avoir accès au troisième bras (bras nouveau/new) qui est bloqué par une porte opaque (Figure 42). Les bras autres et nouveaux sont alternativement changés entre les souris. Après les 5 minutes d'exploration, les souris sont sorties du labyrinthe et remises dans leur cage pendant 2 minutes. Durant la phase d'acquisition, les souris sont placées à l'extrémité du bras de départ et peuvent librement circuler entre les trois bras du labyrinthe durant 5 minutes. La durée passée dans chaque bras est alors enregistrée par le logiciel EthovisionXT (Noldus, Netherlands). Des mises au point ont été réalisées au préalable afin de s'assurer que la préférence soit imputable aux indices extérieurs (non montré).



*Figure 42 Représentation schématique du labyrinthe en Y.*

### *Open Field*

L'activité locomotrice des animaux est déterminée en mesurant la distance parcourue dans une arène carrée pendant 10 minutes grâce au logiciel EthovisionXT (Noldus, Netherlands).

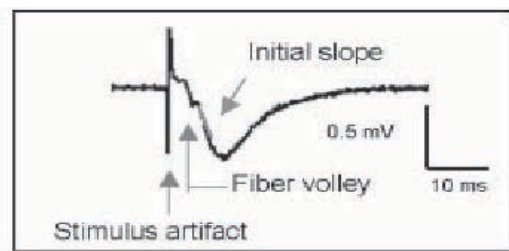
### **Microdialyse**

Les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  et leurs contrôles de portée ont été anesthésiées et placées dans un cadre de stéréotaxie (David Kopf, USA) avec leur température corporelle maintenue à 37,5°C à l'aide d'une couverture chauffante (Harvard Instruments, USA). Le crâne a été percé et, une sonde de microdialyse d'un diamètre de 1 mm (NeuroChem, Lyon Neuroscience Research center, Lyon, France) a été implantée dans l'hippocampe dorsal droite ou gauche (coordonnées relatives au bregma : AP -1,8mm, L±1,5mm, V -2,4mm sous la surface du crane). Cette region a alors été perfusée avec un débit de l'ordre du  $\mu\text{L}/\text{min}$  par du liquide cerebrospinal artificiel (149mM NaCl, 2.80mM KCl, 1.2mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2mM  $\text{CaCl}_2$ , 2.78mM de tampon phosphate pH 7,4). Deux heures sont nécessaires avant le recueil des échantillons. Trois fractions sont alors collectées, chacune l'étant toutes les cinq minutes. A la fin de la manipulation, les souris sont décapitées puis le placement de la canule est vérifié. Les

dialysats sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse. Le jour de l'analyse, les niveaux de GABA et glutamate sont déterminés par une méthode d'électrophorèse capillaire conjuguée à la fluorescence à laser comme décrit précédemment (Sauvinet et al., 2003).

### Enregistrement électrophysiologique

Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, le cerveau récupéré et l'hippocampe disséquée puis placée dans une solution de Krebs à  $4^{\circ}\text{C}$  saturée à 95%  $\text{O}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$ . La solution de Krebs est composée (en mM) : NaCl 124, KCl 3,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  2 et glucose 10 ajusté à pH 7,4. Des tranches de  $400\mu\text{M}$  sont obtenues à l'aide d'un « shopper » McEwen et les potentiels de champs excitateurs post-synaptiques (fEPSP) ont été enregistrés dans le striatum radium de la CA1 de l'hippocampe. Les fEPSPs



**Figure 43** Représentation d'un potentiel de champs excitateur post-synaptique. La valeur de la pente initiale (initial slope) a été mesurée au cours de l'enregistrement et traduit la force synaptique

ont été quantifiés par la mesure de la pente initiale du potentiel (Figure 43). La LTD a été induite par une stimulation à basse fréquence (LFS : Low Frequency Stimulation), caractérisée par l'application de 1500 impulsions de 2Hz pendant 10 minutes. Trois vagues de stimulation ont été appliquées, séparées l'une de l'autre d'un intervalle de 10 minutes.

### Analyses biochimiques

#### Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est une approche permettant la séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (pHi) et de leur poids moléculaire. Elle nous a notamment permis de mesurer l'acidité de la protéine tau qui résulte presque exclusivement de son niveau de phosphorylation (Bretteville et al., 2009). Les homogénats de protéines (résultat de pool entre 5-6 souris par groupe) ont donc été précipités au méthanol/chloroforme. 15 mg de protéines ont été dissoutes dans un tampon contenant 7M urée, 2M thiourée, 4% CHAPS et 0,6% pharmalytes. Les lysats ont été chargés sur des bandes de gel présentant un gradient de pH de 3 à 11 (ReadyStrip, Amersham GE) et ont subi l'électro-isofofocalisation dans une cuve Protean IEF (Amersham GE), conformément aux données du fabricant. La seconde dimension est une électrophorèse SDS-PAGE classique. Les formes totales de tau ont alors été mesurées par l'application de l'anticorps Tau-Cter.

### Fractions sarkosyl-solubles/insolubles

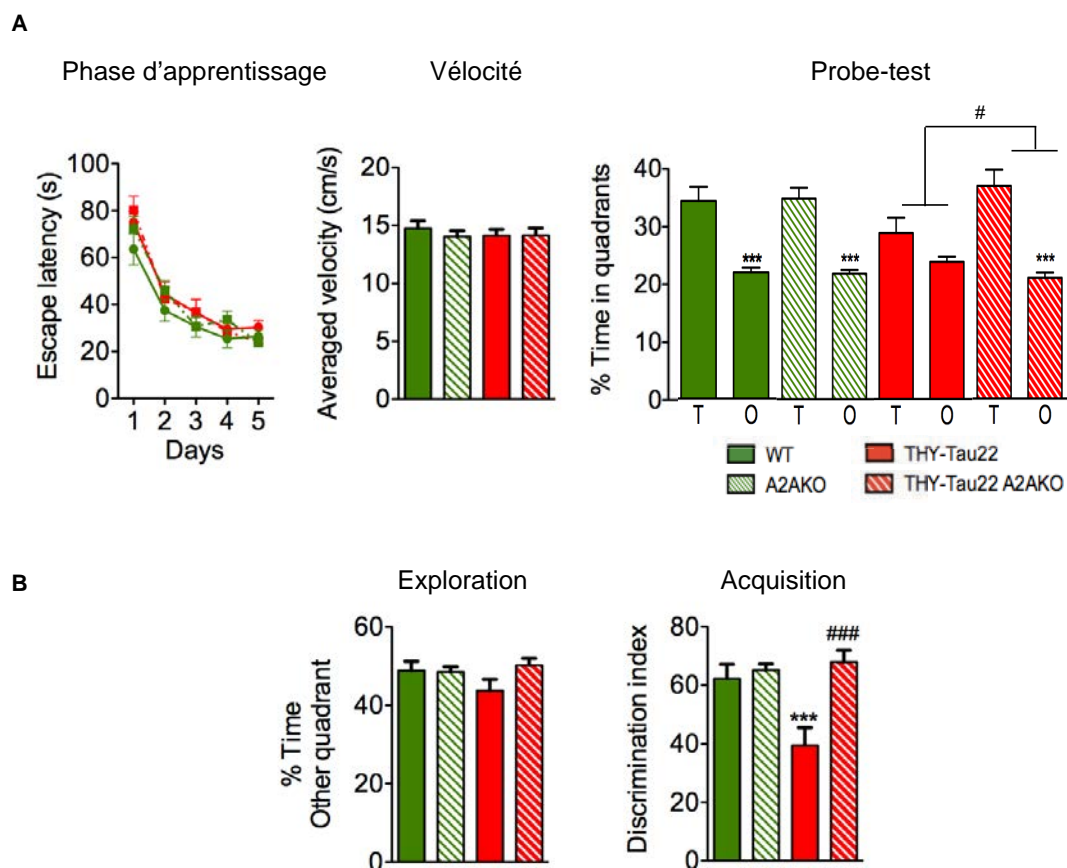
Les homogénats totaux de protéines ont été centrifugés à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants, repris et incubés 1 heure dans une solution contenant 1% de sel N-laurylsarkosine de sodium (Sigma) à température ambiante et sous agitation, ont été centrifugés à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C. Les fractions solubles et insolubles de tau se retrouvent alors respectivement dans le surnageant et le culot. Ces deux fractions ont été diluées dans du LDS2x avec un ratio insoluble/soluble de 1/12 et déposés sur gel Novex (Invitrogen).

## Résultats

### 1. L'invalidation des récepteurs $A_{2A}$ prévient le développement des altérations mnésiques chez les souris THY-Tau22

Afin d'évaluer l'impact de l'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  sur le développement des troubles mnésiques chez les souris THY-Tau22, nous avons réalisé les tests de la piscine de Morris (Morris water maze), et du labyrinthe en Y (Y-maze).

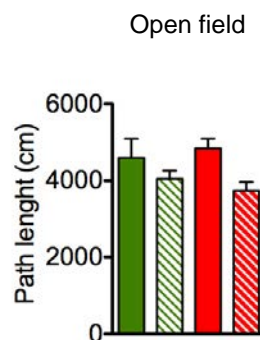
Concernant le test de la piscine de Morris présenté en figure 44-A, nous n'avons observé aucune différence significative entre les groupes au cours de la phase d'apprentissage ( $p=0,098$  two-way ANOVA). L'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  n'a par ailleurs aucune conséquence sur la vitesse de nage des animaux (vélocité) ( $p>0,05$ , one way ANOVA). Soixante-douze heures suivant l'acquisition, l'index de mémorisation des animaux a été évalué au cours du probe-test en mesurant le temps passé dans le quadrant cible et dans les autres quadrants. Les animaux WT et WT  $A_{2A}^{-/-}$  ont une préférence marquée pour le premier avec un pourcentage de temps passé supérieur à 25% (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $34,22\pm 2,44\%$   $p<0,0001$  ; WT  $A_{2A}^{-/-}$   $34,67\pm 1,88\%$   $p<0,0001$ ). L'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  n'a aucune incidence sur les performances mnésiques chez les animaux contrôles. Conformément à ce qu'il a été décrit dans le modèle (Burnouf et al., 2013), les souris THY-Tau22 présentent des altérations mnésiques, ce qui se traduit par une absence de préférence pour le quadrant cible (THY-Tau22  $28,72\pm 2,61\%$   $p=0,075$ ) et un pourcentage de temps passé dans ce quadrant réduit par rapport aux souris contrôles bien que non significatif en one way ANOVA (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $34,22\pm 2,44\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$   $28,72\pm 2,61\%$   $p=0,106$ ). Les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  ont quant à elles une préférence marquée pour le quadrant cible par rapport aux autres quadrants avec un pourcentage de temps passé dans le premier significativement plus élevé que 25% (THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$   $36,82\pm 2,82\%$   $p<0,0001$ ). Il a enfin été observé que les souris THY-Tau22 invalidées pour le récepteurs  $A_{2A}$  passent significativement plus de temps dans le quadrant cible que les souris THY-Tau22 (THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$   $28,72\pm 2,61\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$   $36,82\pm 2,82\%$   $p=0,0257$  one-way ANOVA) avec un pourcentage de temps passé dans ce quadrant comparable aux souris WT  $A_{2A}^{+/+}$  (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $34,22\pm 2,44\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$   $36,82\pm 2,82\%$   $p=0,47$ ). Ces résultats mettent en évidence une prévention des altérations de mémoire spatiale chez les souris THY-Tau22 par l'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$ .



**Figure 44** Normalisation des performances mnésiques chez les souris  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$ . Le temps mis par les souris pour atteindre la plate forme immergée durant le test de la piscine de Morris n'est pas modifié entre les quatre génotypes, de même que la vélocité. En revanche, durant la phase du probe-test, l'absence de préférence pour le quadrant cible observée chez les souris  $THY-Tau22$  est retrouvée lors du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  chez ces souris avec un pourcentage de temps passé comparable aux souris contrôles (A). Les résultats obtenus au test du Y-Maze démontrent également une prévention des altérations de mémoire spatiale chez les souris  $THY-Tau22$  invalidées pour le récepteur  $A_{2A}$  (B). Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. Probe-test : \*\*\*  $p < 0,001$  Target (T) vs Other (O) Test t de Student ; #  $p < 0,05$   $THY-Tau A_{2A}^{+/+}$  vs  $THY-Tau A_{2A}^{-/-}$  one-way ANOVA. Labyrinthe en Y : \*\*\*  $p < 0,001$  WT  $A_{2A}^{+/+}$  vs WT  $A_{2A}^{-/-}$  ###  $p < 0,001$   $THY-Tau A_{2A}^{+/+}$  vs  $THY-Tau A_{2A}^{-/-}$  one-way ANOVA.  $n = 6$  à  $12$  par groupe.

La mémoire spatiale des animaux  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$  a été évaluée dans un second paradigme expérimental qu'est celui du labyrinthe en Y. Contrairement au test de la piscine de Morris,

celui-ci permet plutôt d'investiguer la mémoire spatiale à court terme même si les deux tests sollicitent la même structure cérébrale, principalement l'hippocampe. Durant la phase d'exploration du test, les animaux exploitent les deux bras du labyrinthe ouverts (Bras de départ – Bras autre). Nous n'avons alors révélé aucune différence significative entre les quatre génotypes (Figure 44-B, premier histogramme), le pourcentage de temps passé dans l'autre bras avoisinant les 50% (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $48,87 \pm 2,33\%$  ; WT  $A_{2A}^{-/-}$   $48,50 \pm 1,38\%$  ; THY-Tau  $A_{2A}^{+/+}$   $43,79 \pm 2,88\%$  ; THY-Tau  $A_{2A}^{-/-}$   $50,24 \pm 1,76\%$   $p=0,2525$  one-way ANOVA). Après 2 minutes de rétention, le troisième bras est ouvert et le pourcentage de temps passé dans ce dernier par rapport au bras autre est mesuré comme index mnésique (Figure 44-B, deuxième histogramme). Le profil des résultats est similaire à celui obtenu au cours du test de la piscine de Morris, avec une normalisation significative de la mémoire spatiale chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  par rapport aux souris THY-Tau22 (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $62,29 \pm 4,88\%$  ; WT  $A_{2A}^{-/-}$   $65,23 \pm 2,07\%$  ; THY-Tau  $A_{2A}^{+/+}$   $39,51 \pm 5,96\%$  ; THY-Tau  $A_{2A}^{-/-}$   $67,98 \pm 3,97\%$   $p=0,0003$  one way ANOVA).



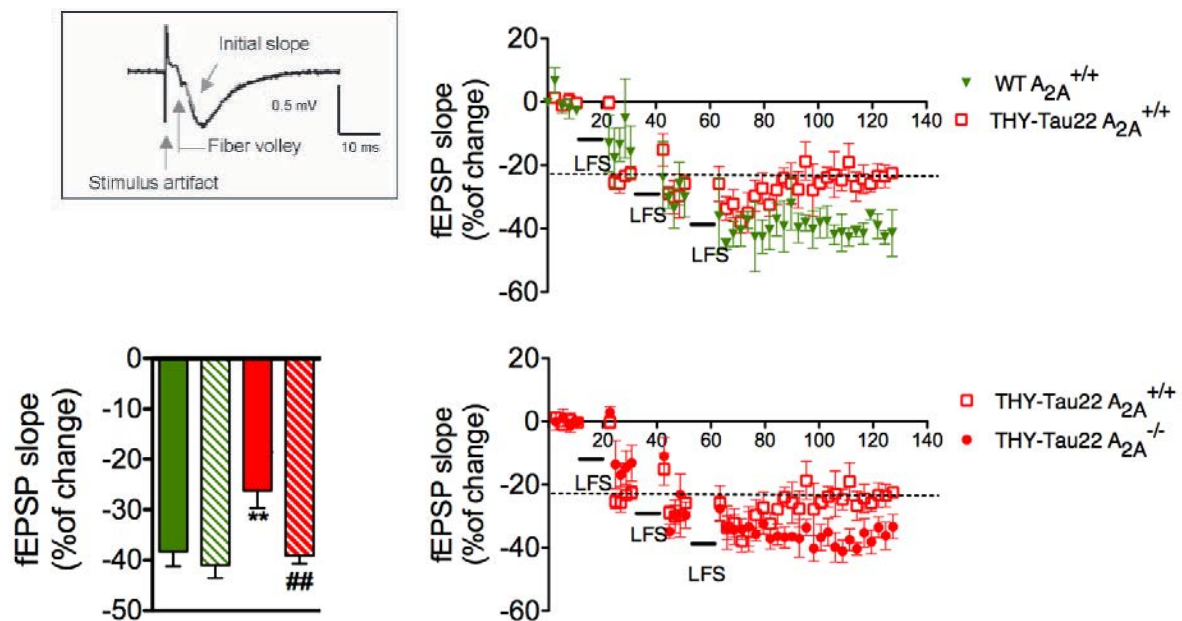
**Figure 45** Absence d'altérations locomotrices chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . La distance mesurée pendant les dix minutes du test n'est pas différente entre les quatre génotypes. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne.  $n=6$  à  $14$  par groupe

Les récepteurs  $A_{2A}$  sont principalement exprimés dans le striatum, une structure appartenant aux ganglions de la base et impliquée dans la coordination motrice (Ribeiro et al., 2003). Compte tenu de l'hypoactivité des souris invalidées pour le récepteur (Ledent et al., 1997), l'activité locomotrice des souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  a été évaluée par le test de l'open-field. Au cours de ce test, la distance parcourue par les animaux a été mesurée pendant 10 minutes et aucune différence significative n'est mise en évidence entre les quatre génotypes ( $p=0,226$  one-way ANOVA) suggérant l'absence d'altération locomotrices majeures (Figure 45). Toutefois, une légère tendance d'hypo-locomotion est retrouvée chez les souris invalidées

pour le récepteur  $A_{2A}$  (indépendamment du génotype tau), confirmant les résultats de Ledent et al., 1997.

## 2. Modulation de la plasticité synaptique chez les souris $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$

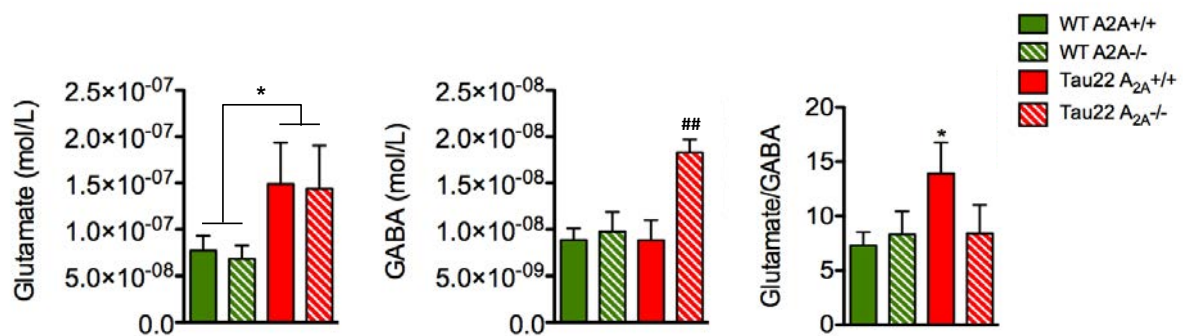
Les altérations mnésiques retrouvées chez les souris  $THY-Tau22$  peuvent être la conséquence d'un défaut de maintien de la LTD, ces deux phénomènes étant associé dans ce modèle (Van der Jeugd et al., 2011). Or, compte tenu des effets des récepteurs  $A_{2A}$  sur la plasticité synaptique, nous avons investigué la LTD chez les souris  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$ .



**Figure 46** Absence de défaut de maintien de la LTD chez les souris  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$ . La LTD a été induite par 3 LFS. L'évolution de la pente a été mesurée durant la totalité de l'enregistrement. Les animaux  $THY-Tau22 A_{2A}^{+/+}$  présentent une réduction de cette pente traduisant un défaut de maintien de la LTD à partir de 80 minutes et qui devient significative à 120 minutes par rapport aux autres groupes. La mesure de cette pente à 120 minutes est représentée par l'histogramme de gauche. Les souris  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$  ont une pente comparable au groupe WT et donc une absence de défaut de maintien de la LTD au cours du temps. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. : \*\*  $p < 0,01$   $WT A_{2A}^{+/+}$  vs  $THY-Tau22 A_{2A}^{+/+}$  ; ##  $p < 0,01$   $THY-Tau22 A_{2A}^{+/+}$  vs  $THY-Tau22 A_{2A}^{-/-}$  one-way ANOVA  $n=4$  à 6 par groupe.

Les potentiels de champs excitateurs post-synaptiques ou fEPSP (field Excitatory Post Synaptic Potential) ont été enregistrés dans la CA1 après une stimulation des collatérales de

Schaeffer provenant de la CA3. Une déflexion négative apparaît alors caractérisée par une pente dont l'inclinaison reflète la force synaptique (Figure 46, schéma gauche). LA LTD a été induite par trois vagues de stimulation à basse fréquence ou LFS (Low Frequency Stimulation) créant de fait une dépotentialisation qui se maintient et a été enregistrée ici pendant 120 minutes. Les tracés de la figure 46 (droite) représentent ici l'évolution de la pente durant l'enregistrement. Les animaux WT et WT  $A_{2A}^{-/-}$  ont une LTD comparable à 120 minutes (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $-38,31 \pm 2,90\%$  vs WT  $A_{2A}^{-/-}$   $-40,93 \pm 2,64\%$   $p=0,497$  one-way ANOVA). L'invalidation du récepteur n'a donc aucune incidence sur le maintien de la LTD chez les animaux contrôles. A l'inverse et conformément à ce qu'il a précédemment été observé dans le modèle (Van der Jeugd et al., 2011), les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  présentent un défaut de maintien de la LTD qui est significatif à 120 minutes (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $-38,31 \pm 2,90\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$   $-26,18 \pm 3,52\%$   $p=0,008$  one-way ANOVA). L'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  chez les souris THY-Tau22 restaure de manière significative la LTD par rapport aux souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  (THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$   $-26,18 \pm 3,52\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$   $-39,16 \pm 1,59\%$   $p=0,0039$  one-way ANOVA) avec une pente qui est comparable aux souris contrôles (WT  $A_{2A}^{+/+}$   $-38,31 \pm 2,90\%$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$   $-39,16 \pm 1,59\%$   $p=0,826$  one-way ANOVA). La normalisation de la LTD chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  peut donc être une explication à l'absence de déficits mnésiques.



**Figure 47** Mesure de la concentration basale de glutamate et GABA chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . Voir le texte pour les explications. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. Concentration de glutamate : \*  $p < 0,05$  WT vs THY-Tau22 (indépendamment du génotype  $A_{2A}$ ) one-way ANOVA ; Concentration de GABA : ##  $p < 0,01$  WT et THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  one-way ANOVA. Glutamate/GABA : \*  $p < 0,05$  WT  $A_{2A}^{+/+}$  vs THY-Tau22 one-way ANOVA  $n=5$  à  $10$  par groupe.

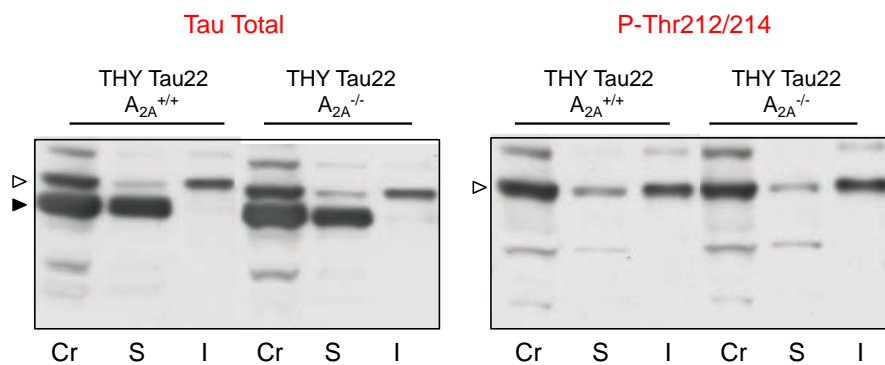


Compte-tenu de l'implication des récepteurs A<sub>2A</sub> dans la libération de neurotransmetteurs et leur participation aux phénomènes d'excitotoxicité en condition pathologique, les niveaux extracellulaires de glutamate, mais également de GABA ont été mesurés par micro-dialyse dans l'hippocampe dorsal des souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> et leurs contrôles de portée. Les résultats sont présentés en figure 47. Les concentrations de glutamate sont comparables entre les animaux WT A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> et WT A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> (WT A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 7,71x10<sup>-8</sup>±1,61x10<sup>-8</sup> M vs WT A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> 6,82x10<sup>-8</sup>±1,46x10<sup>-8</sup> M p=0,818, one-way ANOVA) témoignant d'une absence d'effet de l'inactivation du récepteur A<sub>2A</sub> chez les animaux contrôles. En revanche, il apparaît une augmentation significative de la concentration extracellulaire de glutamate basale chez les souris THY-Tau22 par rapport aux animaux WT indépendamment du génotype A<sub>2A</sub> (p=0,0244 two-way ANOVA). Concernant les niveaux de base de GABA, l'inactivation du récepteur A<sub>2A</sub> ne les modifie pas chez les animaux contrôles (p=0,712 one-way ANOVA), de même, les souris THY-Tau22 présente une concentration extracellulaire de GABA comparable à celle des animaux WT (WT A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 8,89x10<sup>-9</sup>±1,21x10<sup>-9</sup>M vs THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 8,85x10<sup>-9</sup>±2,13x10<sup>-9</sup> M p=0,99 one-way ANOVA). Toutefois, elle s'élève chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> de manière significative (p=0,0047 one-way ANOVA). Le tonus activateur a enfin été calculé par le ratio de la concentration de glutamate sur la concentration de GABA. Ce tonus est augmenté significativement chez les souris THY-Tau22 par rapport aux animaux contrôles (WT A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 7,31±1,21 vs THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 13,92±2,85 p=0,05 one-way ANOVA), alors que l'inactivation des récepteurs A<sub>2A</sub> chez les souris THY-Tau22 le normalise dû aux niveaux plus élevés de GABA bien que non significativement (THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 13,92±2,85 vs THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> 8,41±2,62 p=0,13 one-way ANOVA) à des valeurs comparables au groupe contrôle (WT A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> 7,31±1,21 vs THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> 8,41±2,62 p=0,76 one-way ANOVA). Cette normalisation du tonus chez les animaux THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> peut donc réduire les phénomènes d'excitabilité neuronale chez les souris THY-Tau22 et participer à l'amélioration du statut cognitif de ces animaux.

### 3. Réduction de l'hyperphosphorylation de tau chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>

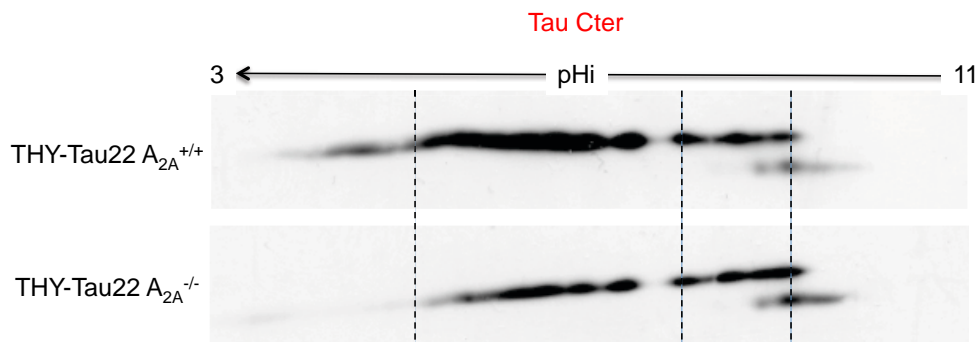
Les conséquences de l'inactivation des récepteurs A<sub>2A</sub> sur la pathologie tau hippocampique des animaux THY-Tau22 ont ensuite été évaluées. Dans un premier temps, nous avons investigué les niveaux d'agrégation de la protéine tau en mesurant la proportion de ses formes solubles et insolubles au moyen d'un protocole de fractionnement biochimique. L'utilisation d'un anticorps Tau-Cter permet de voir la totalité des espèces de tau (quelque soit le niveau de

phosphorylation) et, comme on peut le voir dans la figure 48 (gauche), la distribution des formes solubles et insolubles est identique entre les animaux THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  et THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . L'utilisation de l'anticorps AT100 permet de visualiser l'épitope conformationnel phosphorylé aux site Thr212 et Ser214. Cette phosphorylation est retrouvée uniquement en condition pathologique et se retrouve majoritairement dans les espèces insolubles de tau, ce qui se confirme ici par une immunoréactivité de l'anticorps AT100 plus forte dans les fractions insolubles que solubles (Figure 48-droite). Toutefois la proportion de ces espèces insolubles phosphorylées ne diffère pas entre les deux génotypes, suggérant une absence d'effet du récepteur  $A_{2A}$  sur l'agrégation de la protéine tau.



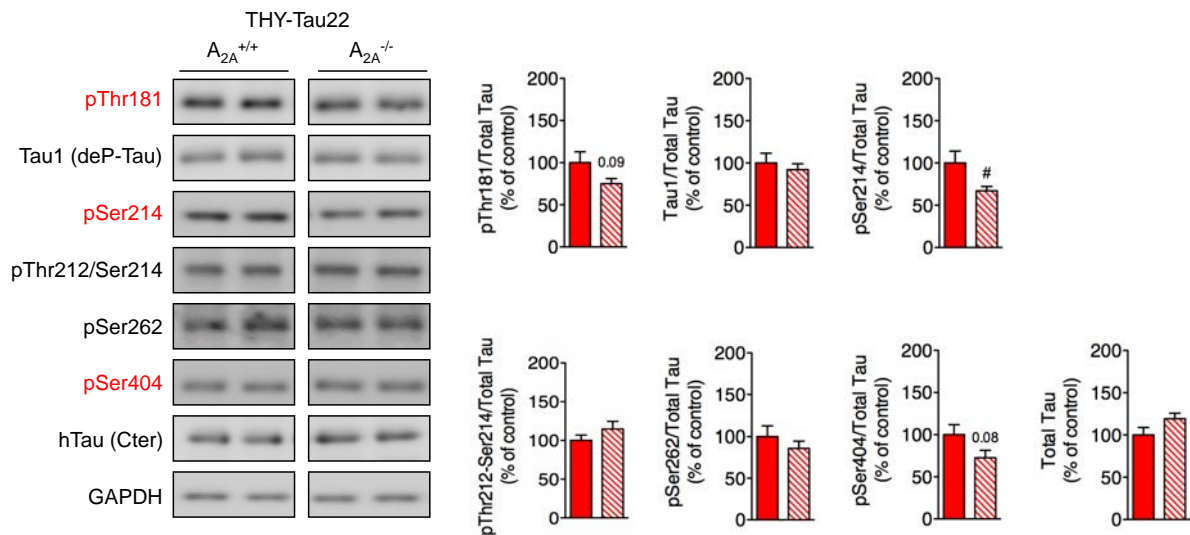
**Figure 48** Au travers d'un protocole de fractionnement biochimique, les formes solubles (S) et insolubles (I) de la protéine tau ont été révélées chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  et THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  par électrophorèse monodimensionnelle. La distribution des formes insolubles totales (gauche) et anormalement phosphorylées aux sites Thr212/Ser214 (droite) a été observée mais aucune différence n'existe entre les deux génotypes, suggérant une absence d'effets des récepteurs  $A_{2A}$  sur l'agrégation de tau dans le modèle THY-Tau22. La piste Cr représente les espèces de tau avant fractionnement. Espèces de tau peu (▼) ou fortement (▷) phosphorylées

Le niveau de phosphorylation de la protéine tau a ensuite été évalué. Compte tenu du nombre élevé de site potentiel de phosphorylation présent (plus de 80, Sergeant et al., 2008), une électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée dans un premier temps. Nous avons alors pu mettre en évidence par l'utilisation d'un anticorps révélant les espèces totales de tau (Tau Cter), une réduction des isovariants acides de la protéine chez les animaux THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  (Figure 49), sans modification du poids moléculaire apparent, suggérant une réduction de la phosphorylation globale de la protéine tau.



**Figure 49** Phosphorylation globale de la protéine Tau chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . Le déplacement vers les pH acides des isovariants de tau chez les animaux THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  suggère une réduction des niveaux de phosphorylation de la protéine tau.  $n=5$  à  $7$  par groupe (pool).

Dans l'objectif de confirmer les résultats précédents, mais également de déterminer si cette réduction affecte spécifiquement certains épitopes, nous avons procédé à une analyse de la phosphorylation de tau par électrophorèse monodimensionnelle via l'utilisation d'anticorps phospho-spécifiques. La phosphorylation aux sites Thr212/Ser214 (AT100), Ser262 et Ser195/198/199/202 (Tau1) n'est pas modifiée entre les animaux THY-Tau22 et THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . En revanche, la phosphorylation de l'épitope Ser214 est significativement réduite chez les animaux THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  par rapport aux THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  ( $-32,86 \pm 14,02$  par rapport aux souris THY-Tau22  $p=0,042$ , test t de Student). De la même manière, la phosphorylation sur l'épitope Thr181 et Ser404 est diminuée chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  (respectivement  $-24,99 \pm 13,58\%$  ;  $p=0,09$  et  $-27,39 \pm 14,60\%$  ;  $p=0,08$  ; test t de Student). Ces résultats mettent alors en évidence un effet de l'inactivation des récepteurs  $A_{2A}$  sur la phosphorylation de tau (Figure 50).

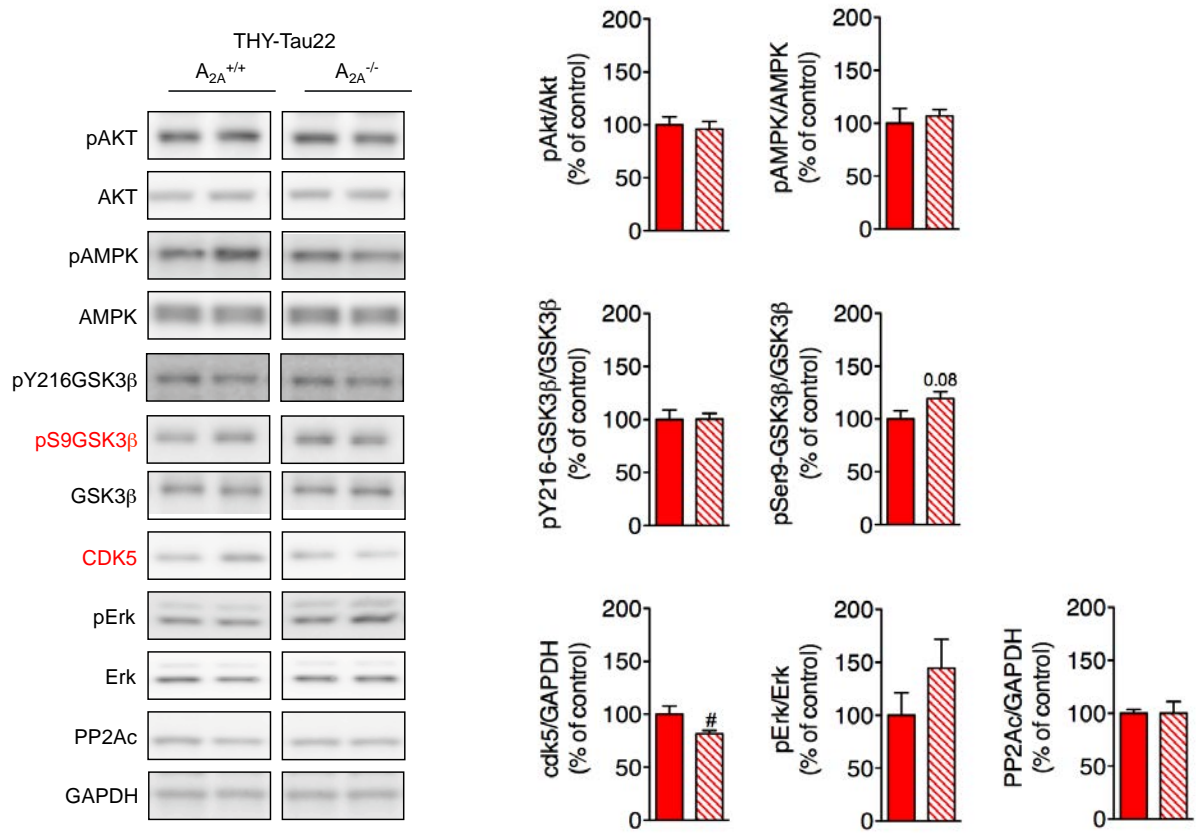


**Figure 50** Phosphorylation de la protéine Tau chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>. Les électrophorèses monodimensionnelles SDS-PAGE mettent en évidence une réduction de la phosphorylation de tau aux épitopes Ser214 et Thr181. La quantification des espèces phosphorylées de tau est normalisée sur la quantité totale de tau (Tau-Cter) et la charge protéique (GAPDH). Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe ± écart à la moyenne. \*  $p < 0,05$  THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/+</sup> vs THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> test t de Student  $n=6$  et  $7$  par groupe.

#### 4. Modulation de l'activité des kinases GSK3 $\beta$ et CDK5 chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>

L'état de phosphorylation de tau est sous le contrôle d'un équilibre entre l'activité des kinases et phosphatases. Or, il existe plus de 30 kinases capables de phosphoryler la protéine tau (Sergeant et al., 2008). Nous avons donc ciblé les principales kinases pouvant être impliquées dans la réduction de la phosphorylation de tau aux épitopes Thr181, Ser214 et Ser404, notamment GSK3 $\beta$ , Akt, Erk, Cdk5 et AMPK. Comme observé dans la figure 51, le niveau d'expression de ces kinases n'est pas modifié chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>. La phosphorylation d'Akt, d'AMPK et de la GSK3 $\beta$  sur l'épitope Tyr216 n'est pas non plus modifiée. En revanche, nous observons une réduction significative de la phosphorylation de Cdk5 ( $-18,40 \pm 7,86\%$ , par rapport aux souris THY-Tau22  $p=0,04$ ). De la même manière, une augmentation de la phosphorylation inhibitrice de la GSK3 $\beta$  sur l'épitope Ser9 est observée chez les souris THY-Tau2 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> ( $+19,20 \pm 10\%$ , par rapport aux souris THY-Tau22,  $p=0,08$ ), reflétant une baisse de son activité. Une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de

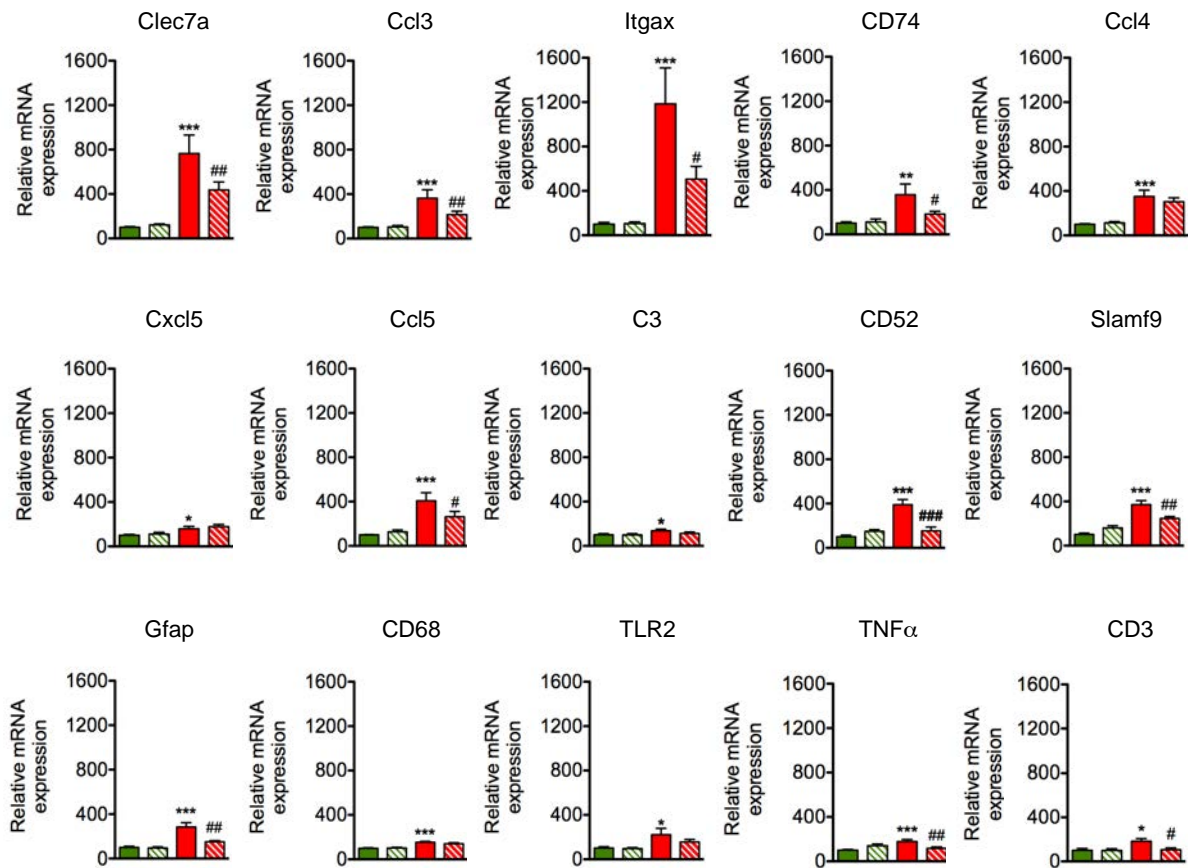
Erk est en revanche observée chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  (+44,33%± 35,6% par rapport aux souris THY-Tau22,  $p=0,24$ ). L'expression de la sous-unité catalytique de la phosphatase PP2A a ensuite été déterminée. Aucune différence n'apparaît entre les deux génotypes. L'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  module alors l'activité des kinases Cdk5 et Gsk3 $\beta$ , contribuant à la réduction de l'hyperphosphorylation de la protéine tau.



**Figure 51** Impact de l'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  sur les kinases de tau et PP2Ac. Des électrophorèses SDS-PAGE ont été réalisées par l'utilisation d'anticorps ciblant les formes totales et phosphorylées de plusieurs kinases de tau et de PP2Ac. Les résultats indiquent une réduction de pS9GSK3 $\beta$  et CDK5. Les phospho-épitopes ont été quantifiés par rapport à leurs formes totales respectives. L'expression totale a été quantifiée par rapport à la GAPDH. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. #  $p < 0,05$  THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  test t de Student  $n=6$  et  $7$  par groupe.

## 5. Réduction du statut neuro-inflammatoire chez les souris THY-Tau22 $A_{2A}^{-/-}$

Nous avons précédemment observé une réponse neuro-inflammatoire progressive chez les souris THY-Tau22 qui est associée au développement de la pathologie tau et des troubles mnésiques. Par ailleurs, le blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> présente des effets anti-inflammatoires au niveau central avec des conséquences bénéfiques dans certaines situations neuropathologiques (Yu et al., 2008 ; Dai et al., 2010 ; Rebola et al., 2011). Dans ce contexte, l'expression transcriptionnelle de plusieurs marqueurs inflammatoires a été déterminée dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>. Comme observé dans la figure 52, l'expression des marqueurs Clec7a (p<0,0001), Ccl3 (p<0,0001), Itgax (p<0,0001), CD74 (p=0,006), Ccl4 (p<0,0001), Cxcl5 (p=0,017), Ccl5 (p=0,0003), C3 (p=0,043), Cd52 (p<0,0001), Slamf9 (p<0,0001), Gfap (p<0,0001), Cd68 (p<0,0001), TLR2 (p=0,015), TNFα (p=0,0003) et CD3 (p=0,015) est significativement augmentée chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/-</sup> par rapport aux animaux contrôles (one-way ANOVA), ce qui est conforme à ce qui avait déjà été observé. Par ailleurs, l'inactivation des récepteurs A<sub>2A</sub> chez les souris WT n'induit aucune modification transcriptionnelle de ces marqueurs inflammatoires. En revanche, il a été observé une réduction significative de l'expression de Clec7a (p=0,007), Ccl3 (p=0,009), Itgax (p=0,01), CD74 (p=0,030), CD52 (p<0,0001), Slamf9 (p=0,0016), Gfap (p=0,0016) et TNFα (p=0,0042) et CD3 (p=0,011) chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> par rapport aux animaux THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>+/-</sup> (one-way ANOVA). Ces résultats suggèrent alors une réduction de la réponse neuro-inflammatoire chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>, ce qui peut alors contribuer à réduire la pathologie tau ainsi que les troubles comportementaux.



**Figure 52** Expression transcriptionnelle de différents marqueurs inflammatoires observée augmentée chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$ . Parmi les marqueurs étudiés, l'expression de Clec7a, Ccl3, Itgax, CD74, Ccl5, CD52, Slamf9, GFAP et TNF $\alpha$  est significativement réduite chez les animaux THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  par rapport au groupe THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$ , suggérant une baisse de la réponse neuro-inflammatoire. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  WT  $A_{2A}^{+/+}$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  vs THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ , one-way ANOVA.  $n = 6$  à  $11$  par groupe.

## Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent que le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  prévient le développement d'altérations mnésiques chez les souris THY-Tau en parallèle d'une modulation de la plasticité synaptique et d'une réduction de l'hyperphosphorylation de tau et de la réponse neuro-inflammatoire.

L'invalidation génétique des récepteurs  $A_{2A}$  chez les souris THY-Tau22 induit une prévention des altérations de mémoire spatiale tels que révélés par les tests de la piscine de Morris ou du labyrinthe en Y. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études où le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  améliore les performances cognitives dans différentes situations marquées par des déficits mnésiques telles qu'observées dans des modèles de vieillissement (Prediger et al., 2005a), chez le rat hypertendu (Prediger et al., 2005b) ou encore suite à l'injection aigüe de peptide  $A\beta$  (Canas et al., 2009). Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont probablement différents et dépendants des processus délétères mis en jeu dans chaque cas. Il a notablement été observé un rôle bénéfique du blocage des récepteurs  $A_{2A}$  au cours de situations dans lesquelles les altérations cognitives s'installent progressivement, et non au cours de phénomènes de toxicité aigüe telle qu'induite par l'injection de scopolamine ou de MK-801 (Cunha et al., 2008 - discussion), respectivement un antagoniste des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine et des récepteurs canaux NMDA.

Il n'a par ailleurs été observé aucune modulation de la mémoire spatiale chez les souris contrôles invalidées pour le récepteurs  $A_{2A}$ . Ces résultats sont cohérents avec les différentes études réalisées observant un impact de la modulation des récepteurs  $A_{2A}$  principalement sur la mémoire de travail, dépendante de l'intégrité corticale (Giménez-Llort et al., 2008 ; Zhou et al., 2009). Nos résultats peuvent alors être interprétés comme une prévention des altérations comportementales induite par la pathologie tau hippocampique.

L'activation endogène des récepteurs  $A_{2A}$  participant à la formation de la LTP hippocampique dans la synapse CA3-CA1 (Fontinha et al., 2009 ; Dias et al., 2012 ; Costenla et al., 2011), le bénéfice cognitif apporté par le blocage de ces récepteurs dans le modèle THY-Tau22 apparaît pour le moins paradoxal. Bien que moins étudié que la LTP, la LTD hippocampique est le second processus synaptique mis en jeu dans la consolidation de la mémoire spatiale. Une altération de la LTD a précédemment été observée chez les souris THY-Tau22 (Van der Jeugd et al., 2011), ainsi que dans cette étude. Or il a été démontré qu'une perturbation de la LTD est associée à des déficits mnésiques (Altinbilek et Manahan 2007 ; Ge et al., 2010 ; Dong et al., 2013), corrélant de fait les défauts de la LTD aux



altérations de mémoire spatiale dans la lignée THY-Tau22. Nous avons observé au cours de cette étude une normalisation de la LTD chez les souris THY-Tau22 invalidées pour le récepteur  $A_{2A}$ , ce qui peut alors au moins partiellement contribuer au bénéfice cognitif observé. Ces résultats contrastent toutefois avec une étude récente démontrant que l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  participe à la mise en place d'une LTD dépendante des récepteurs kainates (récepteurs ionotropiques au glutamate) au sein des fibres moussues de l'hippocampe (Chamberlain et al., 2013). Les mécanismes moléculaires mis en jeu chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  diffèrent alors probablement de ceux impliqués durant l'activation endogène des récepteurs  $A_{2A}$ .

Les récepteurs  $A_{2A}$  participent également à la plasticité synaptique de par leur capacité à promouvoir la libération de glutamate (Li et al., 2001 ; Lopes et al., 2002 ; Kanno et Nishizaki 2012). Bien qu'aucune modification de la concentration extracellulaire de glutamate n'ait été observée entre les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{+/+}$  et THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ , le tonus activateur de ces dernières est réduit compte tenu de l'augmentation des niveaux extracellulaires de GABA. Ces derniers résultats contrastent avec le rôle facilitateur exercé par l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  sur la libération neuronale de GABA au sein de l'hippocampe (Cunha et al., 2000), toutefois ils pourraient être le résultat d'une réduction de la recapture neuronale et astrocytaire de GABA par les transporteurs GAT-1 et GAT-3 notamment (Cristóvão-Ferreira et al., 2009 ; Cristóvão-Ferreira et al., 2013). L'augmentation de GABA pourrait alors contrebalancer les effets excitotoxiques potentiels médiés par l'augmentation des niveaux de glutamate. Dans des modèles d'ischémie cérébrale, la réduction des niveaux extracellulaires de glutamate a ainsi été observée comme neuroprotectrice (Mdzinarishvili et al., 2012), de même qu'un ratio Glutamate/GABA plus faible (Xu et al., 2007).

Le développement d'une pathologie tau hippocampique est fortement corrélée à la présence d'altérations mnésiques comme observé dans différents modèles de tauopathie (Polydoro et al., 2009 ; Van der Jeugd et al., 2011 ; Mustroph et al., 2012). La réduction de l'hyperphosphorylation de tau aux épitopes Ser214 et Thr181 peut donc expliquer au moins partiellement l'amélioration des performances mnésiques chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$ . Compte tenu de la présence de plus de 80 sites de phosphorylation présents sur la protéine tau (Sergeant et al., 2008), et donc de la difficulté à tous les étudier, il ne peut être exclu que l'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  chez les souris THY-Tau22 réduise le niveau de phosphorylation sur d'autres épitopes que ceux étudiés. Il n'a par ailleurs pas été observée de réduction des fragments protéolytiques de tau chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  contrairement

à ce qu'il a été démontré chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine (Laurent et al., sous presse), suggérant des mécanismes moléculaires différents dans ces deux conditions vis à vis de tau.

Nous avons précédemment détaillé dans ce manuscrit une augmentation progressive de la réponse neuro-inflammatoire chez les souris THY-Tau22, parallèlement à l'établissement d'une pathologie tau hippocampique et d'altérations mnésiques. Dans cette étude nous observons une réduction de cette réponse neuro-inflammatoire chez les souris THY-Tau22 invalidées pour le récepteur  $A_{2A}$ . Ces résultats sont en accord avec la réduction de l'inflammation centrale induite par le LPS observée chez des rats traités par un antagoniste  $A_{2A}$  (Rebola et al., 2011). Il est toutefois à noter qu'une dichotomie existe entre les effets centraux et périphériques de la modulation des récepteurs  $A_{2A}$  vis à vis de l'inflammation. En effet, alors que l'activation des récepteurs  $A_{2A}$  a des effets anti-inflammatoires et est protectrice en situation d'ischémie affectant différents tissus périphériques tel que le cœur, le poumon, ou encore le foie (pour revue, Haskó et Pacher 2008), leur blocage réduit la libération de cytokines pro-inflammatoires et s'avère neuro-protecteur en situation d'ischémie cérébrale (Chen et Pedata, 2008). De plus, il a élégamment été démontré que l'inactivation sélective des récepteurs  $A_{2A}$  dans les cellules circulantes est neuroprotectrice dans l'ischémie cérébrale et réduit l'expression centrale de cytokines pro-inflammatoires, ce qui est en miroir des effets retrouvés dans l'ischémie hépatique (Yu et al., 2004). Cette différence de fonction entre tissus périphériques et cerveau semble être le résultat des niveaux élevés de glutamate retrouvés en condition pathologique. En effet, dans de telles conditions, il a été observé un changement de signalisation des récepteurs  $A_{2A}$  (PKA=>PKC) faisant de leur activation une stimulation et non plus une inhibition de la réponse neuro-inflammatoire (Dai et al., 2010). Ce faisant, l'invalidation des récepteurs  $A_{2A}$  exerce des effets anti-inflammatoires dans le modèle THY-Tau22 où les niveaux extracellulaires de glutamate sont élevés. L'absence d'effets observés chez les souris WT  $A_{2A}^{-/-}$  suggère une réduction de la réponse neuro-inflammatoire induite par tau, ce qui peut alors avoir des répercussions (directes ou non) sur les processus mnésiques.

En conclusion, cette étude démontre pour la première fois que le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  prévient le développement de troubles mnésiques dans un modèle de tauopathie. Cet effet s'accompagne notamment d'une modulation de la plasticité synaptique ainsi que d'une réduction de l'hyperphosphorylation de tau et de la réponse neuro-inflammatoire. Le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  réduisant la neurotoxicité induite par  $A\beta$  (Dall'Igna et al., 2007 ; Canas et al., 2009) et l'utilisation clinique d'antagonistes de ces

récepteurs ne présentant pas d'effets secondaires notables, les récepteurs  $A_{2A}$  peuvent alors constituer une cible thérapeutique pertinente dans la MA.

# Discussion



## Discussion

La MA est une maladie neurodégénérative actuellement incurable. Les seuls traitements existants sont en réalité des traitements symptomatiques permettant une amélioration de la qualité de vie des patients sans impact réel sur les processus neurodégénératifs. Il s'agit notamment des inhibiteurs d'acétylcholine estérase où encore de la mémantine, un antagoniste des récepteurs NMDA. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents au développement de la pathologie est une étape indispensable à l'établissement de nouvelles approches thérapeutiques préventives et/ou curatives. En ce sens, les recherches actuelles s'orientent notamment sur l'immunothérapie, une stratégie ciblant de manière active (injection d'antigène) ou passive (injection d'anticorps) les protéines tau (Troquier et al., 2012 ; Gu et al., 2013) ou A $\beta$  (Blennow et al., 2012 ; Winblad et al., 2012) dans l'objectif de promouvoir la clairance de leur forme fibrillaire et d'observer un bénéfice cognitif chez le patient. Il est également question de cibler les kinases de tau telles que GSK3 $\beta$  et CDK5 (Onishi et al., 2011 ; Zhang et al., 2013) ou ses phosphatases telle que PP2A (Corcoran et al., 2010) afin de moduler l'état de phosphorylation de la protéine tau. La déstabilisation des agrégats d'A $\beta$  est également une piste thérapeutique intéressante (Hatip et al., 2009 ; Jarmula et Stepkowski 2013), tout comme la recherche de biomarqueurs plasmatiques ou au sein du LCR, ce qui constitue ici une approche préventive à intérêt de diagnostic (Bruggink et al., 2013 ; Dickerson et al., 2013 ; Kiko et al., 2013).

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans une perspective visant à évaluer l'impact de l'environnement sur le développement de la MA et plus particulièrement sur sa composante tau, afin d'identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons mis en évidence un rôle bénéfique de la caféine, un antagoniste non sélectif des récepteurs adénosinergiques (Fredholm et al., 1999), sur le développement d'altérations de mémoires spatiales induites par tau dans le modèle THY-Tau22, effet reproduit par le blocage génétique des récepteurs A<sub>2A</sub> dans cette lignée. Ces résultats sont en accord avec la capacité de la caféine et d'antagonistes spécifiques des récepteurs A<sub>2A</sub> à améliorer les performances cognitives dans différentes situations où d'importants troubles mnésiques existent (Perdigier et al., 2005a ; Prediger et al., 2005b ; Cunha et Agostinho, 2010 ; Leite et al., 2011). Par ailleurs, il est admis que la caféine possède des propriétés pro-mnésiantes limitées (pour revue, Nehlig, 2010), et les effets attentionnels décrits de la molécule n'ont apparemment aucune incidence

sur la mémoire spatiale des animaux comme nous le démontrons par l'absence d'effets de la caféine chez les souris wt traitées dans le test de la piscine de Morris. Par ailleurs, le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  exerce plutôt des effets cognitifs dans le contexte de la mémoire de travail, ce qui fait appel principalement aux structures corticales et non hippocampiques (Giménez-Llort et al., 2007 ; Zhou et al., 2009). Les effets observés sur la mémoire spatiale sont donc la conséquence d'une modulation de l'hyperphosphorylation de tau, de la plasticité synaptique et de la réponse neuro-inflammatoire, ces paramètres étant dérégulés et associés à la progression des troubles cognitifs dans le modèle THY-Tau22

Le stade développemental est un paramètre important à prendre en compte susceptible de moduler les effets bénéfiques observés. En effet, alors que l'inactivation génétique des récepteurs  $A_{2A}$  est neuroprotectrice en situation d'ischémie cérébrale chez l'adulte, notamment dû à une réduction des phénomènes d'excitotoxicité au glutamate (Gui et al., 2009), les souris  $A_{2A}$  KO âgées d'à peine 7 jours sont plus sensibles au phénomène d'ischémie cérébrale et aucun effet bénéfique n'est observé (Adén et al., 2003). De la maturation du SNC dépendent alors les effets de la modulation des récepteurs  $A_{2A}$ . En effet, la caféine ou un antagoniste  $A_{2A}$  administré chez des souris gestantes retarde la migration et l'insertion des neurones GABAérgiques dans la circuiterie hippocampique chez la progéniture, induisant de fait une augmentation de l'excitabilité neuronale. De plus à l'âge adulte, ces derniers présentent des altérations cognitives associées à un dysfonctionnement des neurones GABAérgiques (Silva et al., 2013). Au cours de notre étude, le traitement des souris a débuté à l'âge de 2 mois, n'interférant pas avec la maturation du SNC. De la même manière, bien que l'inactivation génétique des récepteurs  $A_{2A}$  soit constitutive et précoce et puisse contrecarrer la maturation du système GABAérgique, aucune altération comportementale ou de modification des niveaux extracellulaires de GABA n'a été observée chez les souris WT  $A_{2A}^{-/-}$  adultes. L'augmentation de ce dernier paramètre chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  n'est donc pas la conséquence d'un dysfonctionnement précoce de la circuiterie GABAérgique.

Le modèle THY-Tau22 surexprime une protéine tau humaine mutée conduisant au développement d'une pathologie tau hippocampique progressive en parallèle d'altérations comportementales (Van der Jeugd et al., 2011). Ce faisant, la pathologie tau est centrale dans ce modèle et constitue une des premières investigations. Nous avons ainsi observé une réduction de la phosphorylation globale de tau à la fois chez les souris THY-Tau22  $A_{2A}^{-/-}$  et

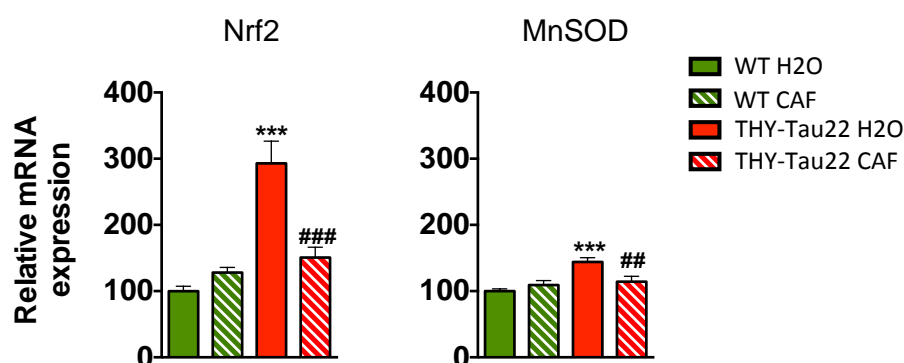
traitées à la caféine, pouvant suggérer des effets de la caféine sur tau médiés par l'inhibition des récepteurs  $A_{2A}$ . Une telle assertion doit cependant être vérifiée au moyen d'études mécanistiques. Au cours de ces études, nous n'avons pu mettre en évidence de réduction commune de la phosphorylation de tau en un épitope particulier parmi ceux étudiés en électrophorèse monodimensionnelle. De plus, les kinases impliquées sont différentes, suggérant des effets  $A_{2A}$ -indépendants chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine. En effet, les récepteurs  $A_1$  sont une autre cible de la caféine compatible avec le traitement administré chez les souris THY-Tau22 et les concentrations plasmatiques et cérébrales retrouvées (300mg/L – 4 $\mu$ M). Il a par ailleurs été observé dans une lignée cellulaire de neuroblastome humain (SY5Y) que leur activation était impliquée dans la phosphorylation de Tau (Angulo et al., 2003), et donc que leur blocage serait bénéfique. Bien qu'il ait été démontré qu'un traitement chronique de caféine induit une augmentation de l'expression transcriptionnelle des récepteur  $A_1$  dans un modèle de traumatisme cérébral (Li et al., 2008), nous n'observons aucune surexpression de ces récepteurs chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine, suggérant l'absence de mécanismes compensatoires conduisant à leur activation. Le blocage de ces récepteurs chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine peut donc contribuer à la réduction de la phosphorylation de tau observée.

Nous avons observé une réduction des espèces tronquées de tau chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine, même si leur nature précise reste à déterminer. Ces espèces, résultat d'une activation des caspases 3,6 ou encore des calpaïnes, possèdent des effets neurotoxiques importants et facilitent l'agrégation de tau et la progression de la pathologie tau (Basurto-Islas et al., 2008 ; Zilkova et al., 2011 ). Il a été démontré une élévation des formes actives de la caspase-3 dans les structures cérébrales affectées par la pathologie tau chez les patients atteints de la MA (Su et al., 2001). De plus, la formation d'espèces de tau clivées par la caspase-3 participe au déclin cognitif (Rissman et al., 2004). De manière intéressante, il a été mis en évidence dans un modèle de culture primaire de neurone, que la caféine réduit l'activité de la caspase-3 induite par  $H_2O_2$  (inducteur de stress oxydant) (Kim et al., 2012). Une réduction de l'activité de la caspase-3 pourrait donc être à l'origine de la baisse des espèces tronquées de tau observées chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine, ce qui est en accord avec le bénéfice cognitif observé. Par ailleurs, les espèces tronquées de tau peuvent promouvoir une réponse neuro-inflammatoire et induire la libération de cytokines pro-inflammatoires (Zilka et al., 2009 ; Kovac et al., 2011). La réduction de ces espèces chez les



souris THY-Tau22 traitées à la caféine se corrèle alors à la baisse significative de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires observée.

Le stress oxydant est une composante retrouvée dans le cerveau de patients atteint de la MA et qui intervient dans la progression de la pathologie (pour revue Pohanka, 2013). Il a en effet été observé que l'administration chronique d'un mimétique de la superoxyde dismutase/catalase (EUK-207), deux protéines impliquées dans la réponse anti-oxydante, réduit la progression des altérations cognitives ainsi que la pathologie tau et amyloïde dans un modèle murin de MA (Clausen et al., 2012). Les propriétés anti-oxydantes de la caféine ont fait l'objet d'intenses investigations. Il a notamment été observé une réduction du stress oxydant généré par le vieillissement chez des rats ayant été traités par de la caféine mais également par un antagoniste des récepteurs A<sub>2A</sub>. Ces modifications s'accompagnent d'une réduction du déficit cognitif (Leite et al., 2011).

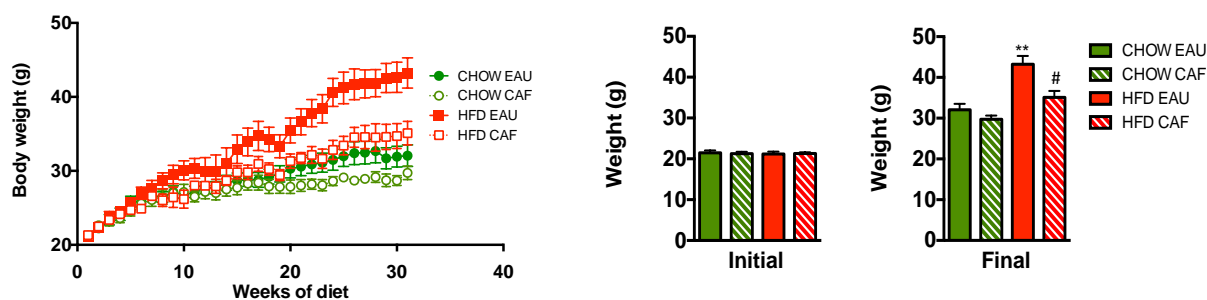


**Figure 54** Expression transcriptionnelle de Nrf2 et MnSOD, deux marqueurs impliqués dans la réponse anti-oxydante. Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \*\*\* $p < 0,001$  WT vs THY-Tau22 ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  THY-Tau22 + H2O vs THY-Tau22 +CAF, one-way ANOVA.  $n = 6$  à  $10$  par groupe.

La protéine Nrf2 joue un rôle central dans le contrôle de la réponse anti-oxydante. Ce facteur de transcription est activé par des niveaux élevés de stress oxydant, il va alors contrôler l'expression d'une panoplie de gènes impliqués dans plusieurs voies (glutathion, protéasome ...) assurant une réponse anti-oxydante adaptée. (pour revue Kensler et al., 2007). Il module par ailleurs la réponse neuro-inflammatoire. Nous avons déterminé l'expression de Nrf2 en qPCR chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine. Il s'avère que la caféine réduit la

surexpression de Nrf2 observée chez les souris THY-Tau22 (Figure 53). Bien que les niveaux de stress oxydant n'aient pas été directement investigués, il se pourrait qu'ils soient élevés chez les souris THY-Tau22 et responsables de l'augmentation de Nrf2. De cette manière, une réponse anti-oxydante est générée comme observée par la surexpression de la MnSOD (Manganèse Superoxyde dismutase) chez les souris THY-Tau22. A l'inverse la réduction de l'expression de Nrf2 et donc de MnSOD chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine serait consécutive à une baisse des niveaux de stress oxydant. Il est évident que la mesure directe du stress oxydant, par le dosage de l'activité du glutathion par exemple, est indispensable pour déterminer si oui ou non ce paramètre intervient dans le modèle THY-Tau22. Il n'empêche que la réduction des altérations cognitives et de la réponse neuro-inflammatoires chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine est corrélée à l'expression de nrf2.

Les effets bénéfiques observés sur la pathologie Tau et les altérations cognitives peuvent résulter de conséquences sur le métabolisme périphérique. En effet, la consommation chronique de caféine semble associée à une réduction du statut pondérale (pour revue : Westerterp-Plantenga, 2010), notamment en augmentant la dépense énergétique induite par une stimulation de la lipolyse (Lally et al., 2012) ou encore de la thermogénèse (Riedel et al., 2012). Il se pourrait par ailleurs qu'elle soit impliquée dans la libération de la leptine et de GLP-1 (glucagon-like peptide-1), 2 molécules impliquées dans la satiété (Hussein et al., 2011).



**Figure 54** Effet de la caféine sur le gain de poids induit par un régime riche en graisse. Un régime HFD (High Fat Diet) a été réalisé pendant 8 mois (de 3 à 11 mois). Le poids des souris a été mesuré chaque semaine afin d'observer la courbe de gain pondéral. Aucune différence de poids n'est à noter entre les groupes au début du régime (premier histogramme). Alors que le HFD induit un gain de poids plus important que le régime standard (CHOW), la caféine contrebalance ce gain. En effet, après 8 mois de régime les souris HFD+CAF pèsent significativement moins que les souris HFD. Aucun effet significatif de la caféine n'est observé sur les souris nourries avec un régime standard (deuxième histogramme). Les résultats sont exprimés comme la moyenne du groupe  $\pm$  écart à la moyenne. \*\* $p < 0,01$  CHOW Eau vs HFD Eau # $p < 0,05$ , HFD Eau vs HFD Caf, one-way ANOVA.  $n = 5$  à  $6$  par groupe.

Nous avons précédemment démontré qu'une obésité induite par un régime riche en graisse est associée à une aggravation des déficits cognitifs et de la pathologie tau hippocampique chez les souris THY-Tau22 (Leboucher et al., 2013). Or, la consommation de caféine réduit le gain de poids induit par un régime riche en graisse chez des souris contrôles comme observée en figure 50. Les effets bénéfiques sur la pathologie tau et les altérations cognitives observées chez les souris THY-Tau22 traitées à la caféine, pourraient alors mettre en jeu des mécanismes moléculaires communs, bien qu'en miroir, de ceux impliqués par le régime obésogène.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence une réponse neuro-inflammatoire dans le modèle THY-Tau22 faisant intervenir des processus de type inné mais également adaptatif avec notamment une infiltration lymphocytaire cérébrale associée à une libération de chémokines. Le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  réduit la libération centrale de cytokines pro-inflammatoires induit par le LPS (Rebola et al., 2011). Ces effets anti-inflammatoires sont imputables aux niveaux élevés de glutamate présents au cours de situations neuropathologique (Dai et al., 2010), expliquant de fait pourquoi le blocage des récepteurs  $A_{2A}$  est neuroprotecteur en situation d'ischémie cérébrale, mais délétères lorsque l'ischémie touche des tissus périphériques (Haskó et Pacher, 2008). En effet, les récepteurs

A<sub>2A</sub> sont également exprimés au sein de cellules circulantes dont les lymphocytes (pour revue Blackburn et al., 2009) et leur activation module la libération de cytokines pro-inflammatoires réprimant alors leur effets délétères.

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune caractérisée par une infiltration massive de lymphocytes dans le cerveau des patients, modélisée in vivo par l'injection de myéline (modèle EAE = Encéphalite Allergique Expérimentale). De manière intéressante, il a été observé dans ce modèle que le blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> prévient du développement de l'EAE en raison d'une réduction de la migration des lymphocytes vers le cerveau (Mills et al., 2008). Par ailleurs, il a été démontré via l'utilisation de souris chimériques (irradiation de moelle et transplantation de cellules hématopoïétiques) que le blocage sélectif des récepteurs A<sub>2A</sub> sur les lymphocytes exerce des fonctions délétères de par l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, mais que leur blocage dans le SNC s'avère protecteur car limite l'entrée des lymphocytes dans le cerveau. (Mills et al., 2012a). Il semblerait que l'expression endothéliale de CD73 (ectonucléotidase impliquée dans la formation extracellulaire de l'adénosine), et l'activation des récepteurs A<sub>2A</sub> au sein du plexus choroïde (une des principales voie neuro-anatomique impliquée dans la migration des lymphocytes au sein du cerveau) soit nécessaire à l'infiltration lymphocytaire (Mills et al., 2008). Par ailleurs, la chémokine CX3CL1 jouerait un rôle prépondérant dans ce phénomène (Mills et al., 2012b). Compte tenu- de la réduction de l'expression transcriptionnelle de CD3 chez les souris THY-Tau22 A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>, il semblerait qu'une baisse de l'infiltration lymphocytaire chez ces souris ne soit pas impossible, même si elle demande à être confirmée. Une modulation de cette infiltration lymphocytaire pourrait alors participer à la prévention des déficits mnésiques observés par l'invalidation des récepteurs A<sub>2A</sub>.

En conclusion, ces travaux de thèse ont démontré l'impact du blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> sur les conséquences physiopathologiques induites par tau dans le modèle THY-Tau22 tant par l'utilisation de l'antagoniste non sélectif qu'est la caféine que par une approche génétique. Cette dernière approche nous donne la preuve du concept d'effets bénéfiques du blocage des récepteurs A<sub>2A</sub> dans un modèle de tauopathie. Elle présente toutefois une valeur thérapeutique limitée et devra notamment être complétée par des études pharmacologiques (non présentées dans ce manuscrit). De la même manière, bien que des effets positifs aient été recensés vis à vis de la neurotoxicité induite par A $\beta$ , (Dall'Igna et al., 2007 ; Canas et al., 2009), les conséquences d'une réduction du blocage de ces récepteurs vis à vis de la

progression de la lésion amyloïde sont actuellement inconnues. De la même manière, nous avons pu mettre en évidence au cours de ce travail une corrélation importante, et ce dans chaque situation, entre le développement des altérations mnésiques et de la pathologie tau d'une part, et la réponse neuro-inflammatoires d'autre part. Il semblerait par ailleurs que l'infiltration lymphocytaire y joue un rôle important qui nécessite des études plus approfondies. Au travers de ces résultats, les récepteurs  $A_{2A}$  semblent donc être une cible thérapeutique d'intérêt dans les tauopathies voire dans la maladie d'Alzheimer.

# Bibliographie



## Bibliographie

### A

- Aarts E, Roelofs A, van Turenout M. (2009). Attentional control of task and response in lateral and medial frontal cortex: brain activity and reaction time distributions. *Neuropsychologia*. 47 (10) : 2089-99.
- Abuznait AH, Cain C, Ingram D, Burk D, Kaddoumi A. (2011). Up-regulation of P-glycoprotein reduces intracellular accumulation of beta amyloid: investigation of P-glycoprotein as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol*. 63 (8) : 1111-8.
- Adén U, Halldner L, Lagercrantz H, Dalmau I, Ledent C, Fredholm BB. (2003). Aggravated brain damage after hypoxic ischemia in immature adenosine A2A knockout mice. *Stroke*. 34 (3) : 739-44.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. (2005). Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 25 (17) : 4217-21.
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW, Yuan Z, Han D, Lin R, Paudel HK. (2003). 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem*. 278 (15) : 12722-8.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 10 (12) : 1538-43.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*. 14 (9) : 1142-9.
- Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M. (2008). Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 18 (2) : 211-9.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120 (16) : 1640-5.
- Allan SM, Rothwell NJ. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2 (10) : 734-44.
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*. 2 (7) : 783-7.
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc*



Natl Acad Sci U S A. 94 (1) : 298-303.

Alpérovitch A, Blachier M, Soumaré A, Ritchie K, Dartigues JF, Richard-Harston S, Tzourio C. (2013). Blood pressure variability and risk of dementia in an elderly cohort, the Three-City Study. *Alzheimers Dement.* (in press).

Altinbilek B, Manahan-Vaughan D. Antagonism of group III metabotropic glutamate receptors results in impairment of LTD but not LTP in the hippocampal CA1 region, and prevents long-term spatial memory. *Eur J Neurosci.* 26 (5) : 1166-72.

Andiné P, Thordstein M, Kjellmer I, Nordborg C, Thiringer K, Wennberg E, Hagberg H. (1990). Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. *J Neurosci Methods.* 35 (3) : 253-60.

Andiné P, Rudolphi KA, Fredholm BB, Hagberg H. (1990). Effect of propentofylline (HWA 285) on extracellular purines and excitatory amino acids in CA1 of rat hippocampus during transient ischaemia. *Br J Pharmacol.* 100 (4) : 814-8.

Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 86 (3) : 582-90.

Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci.* 25 (22) : 5446-54.

Andrews-Hanna JR, Snyder AZ, Vincent JL, Lustig C, Head D, Raichle ME, Buckner RL. (2007). Disruption of large-scale brain systems in advanced aging. *Neuron.* 56 (5) : 924-35.

Angulo E, Casado V, Mallol J, Canela EI, Vinals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R (2003) A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* 13 : 440–451

Aranda JV, Collinge JM, Zinman R, Watters G. (1979). Maturation of caffeine elimination in infancy. *Arch Dis Child.* 54 (12) : 946-9.

Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 142:941–952.

Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tane J, Citron BA, Lin X et al. (2009). Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis* 17 : 661–680.

Arnaud MJ. (1987). The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res.* 31 : 273-313. Review.

Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Rodriguez C, Thun MJ. (2004). Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *Am J Epidemiol.* 160 (10) :

Ashutosh, Kou W, Cotter R, Borgmann K, Wu L, Persidsky R, Sakhuja N, Ghorpade A. (2011). CXCL8 protects human neurons from amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 412 (4) : 565-71.

## **B**

Baik SH, Yoon HS, Kim SE, Kim SH. (2012). Extraversion and striatal dopaminergic

receptor availability in young adults: an [18F] fallypride PET study. *Neuroreport*. 23 (4) : 251-4.

Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. (1999). Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* 5 : 216–224

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch. Eur J Physiol* 447 : 735–743

Bal-Price A, Brown GC. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*. 21 (17) : 6480-91.

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. 6 (8) : 916-9.

Barone JJ, Roberts HR. (1996). Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol*. 34 (1) : 119-29. Review.

Barroso E, del Valle J, Porquet D, Vieira Santos AM, Salvadó L, Rodríguez-Rodríguez R, Gutiérrez P, Anglada-Huguet M, Alberch J, Camins A, Palomer X, Pallàs M, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. (2013). Tau hyperphosphorylation and increased BACE1 and RAGE levels in the cortex of PPAR $\beta/\delta$ -null mice. *Biochim Biophys Acta*. 1832 (8) : 1241-8.

Basurto-Islas G, Luna-Muñoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, García-Sierra F. (2008). Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67 (5) : 470-83.

Bancher C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Fried VA, Smith HT, Wisniewski HM. (1991). Abnormal phosphorylation of tau precedes ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Brain Res*. 539 (1) : 11-8.

Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, Sultan A, Troquier L, Leboucher A, Caillierez R, Grosjean ME, Demeyer D, Obriot H, Brion I, Barbot B, Galas MC, Staels B, Humez S, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Muhr-Tailleux A, Hamdane M, Buée L, Blum D. (2011). Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis*. 43 (2) : 486-94.

Bellucci A, Westwood AJ, Ingram E, Casamenti F, Goedert M, Spillantini MG. (2004). Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *Am J Pathol* 165 (5) : 1643-52.

Bellucci A, Bugiani O, Ghetti B, Spillantini MG. (2011). Presence of reactive microglia and neuroinflammatory mediators in a case of frontotemporal dementia with P301S mutation. *Neurodegener Dis*. 8 (4) : 221-9.

Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 39 (1) : 17-23.

Bertram L, Tanzi RE. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci*. 9 (10) : 768-78.

Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease.

Lancet Neurol 12 (1) : 92-104.

Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT. (2010). Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron*. 68 (1) : 19-31.

Biber K, Vinet J, Boddeke HW. (2008). Neuron-microglia signaling: chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol*. 198 (1-2) : 69-74.

Bishop NA, Lu T, Yankner BA. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 464 (7288) : 529-35.

Blanchard J, Sawers SJ. (1983). The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 24 (1) : 93-8.

Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. (2009). Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol*. (193) : 215-69.

Blennow K, Zetterberg H, Rinne JO, Salloway S, Wei J, Black R, Grundman M, Liu E; AAB-001 201/202 Investigators.(2012). Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 69 (8) : 1002-10.

Block ML. (2008). NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci*. 9 Suppl 2 : S8.

Blum D, Sandau U, Laurent C, Batalha V, Leboucher A, Hamdane M, Pasquier P, Boison D, Buée L, Lopes LV. (2012) Adenosine Receptors and Alzheimer's Disease in Masino S, Boison D, (Eds.), Adenosine : A key link between metabolism and brain activity Springer New York, pp. 385-408.

Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P. (1995). Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett*. 202 (1-2) : 17-20.

Boehm J. (2013). A 'danse macabre': tau and Fyn in STEP with amyloid beta to facilitate induction of synaptic depression and excitotoxicity. *Eur J Neurosci*. 37 (12) : 1925-30.

Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Björkhem I. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett*. 314 (1-2) : 45-8.

Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME. (2008). Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci*. 28 (16) : 4283-92.

Bonati M, Latini R, Galletti F, Young JF, Tognoni G, Garattini S. (1982). Caffeine disposition after oral doses. *Clin Pharmacol Ther*. 32 (1) : 98-106.

Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M. (2001). Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol*. 158 (1) : 63-73.

Botton PH, Costa MS, Ardais AP, Mioranza S, Souza DO, da Rocha JB, Porciúncula LO. (2010). Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice. *Behav Brain Res*. 214 (2) : 254-9.

Braak H, Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82 (4) : 239-59. Review.

- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70 (11) : 960-9.
- Brandt R, Léger J, Lee G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 131 (5) : 1327-40.
- Bretteville A, Ando K, Ghestem A, Loyens A, Bégard S, Beauvillain JC, Sergeant N, Hamdane M, Buée L. (2009). Two-dimensional electrophoresis of tau mutants reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes. *PLoS One.* 2009 ; 4 (3) : e4843.
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* 17 (1) : 89-96.
- Brion JP. (1999). Neurofibrillary tangles and early modification of the neuronal cytoskeleton in Alzheimer's disease and in experimental models. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 154 (6 Pt 2) : 287-94. Review.
- Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, Rajadas J, Zhang H, Tomooka B, Robinson WH, Clark CM, Fagan AM, Galasko DR, Holtzman DM, Jutel M, Kaye JA, Lemere CA, Leszek J, Li G, Peskind ER, Quinn JF, Yesavage JA, Ghiso JA, Wyss-Coray T. (2009). Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (29) : 12145-50.
- Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119 (1) : 182-92.
- Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C. (2002). Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59 (11) : 1764-7.
- Brothers HM, Marchalant Y, Wenk GL. (2010). Caffeine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. *Neurosci Lett.* 2010 480 (2) : 97-100.
- Brown RD, Thorén P, Steege A, Mrowka R, Sällström J, Skøtt O, Fredholm BB, Persson AE. (2006). Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290 (5) : R1324-9.
- Brown JW, Coles AJ. (2013). Alemtuzumab: evidence for its potential in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther.* 7 : 131-8.
- Bruggink K, Kuiperij H, Jahr C, Verbeek M. (2013). The diagnostic value of CSF A $\beta$ 43 in Differentiation of Dementia Syndromes. *Curr Alzheimer Res.* (in press)
- Brynskikh A, Warren T, Zhu J, Kipnis J. (2008). Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav Immun.* 22 (6) : 861-9.
- Buée L, Bussièrre T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev.* 33 (1) : 95-130. Review.
- Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A, Fernandez-Gomez FJ, Troquier L, Eddarkaoui S, Grosjean ME, Demeyer D, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Sergeant N, Hamdane M, Humez S, Popoli P, Buée L, Blum D. (2013). NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of

hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell*. 12 (1) : 11-23.

Butner KA, Kirschner MW. (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol*. 115 (3) : 717-30.

Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 31 (1) : 149-60.

## C

de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, Hyman BT. 2010. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature*. 464 (7292) : 1201-4.

de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*. 73 (4) : 685-97.

Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29 : 14741–14751

Cao C, Loewenstein DA, Lin X, Zhang C, Wang L, Duara R, Wu Y, Giannini A, Bai G, Cai J, Greig M, Schofield E, Ashok R, Small B, Potter H, Arendash GW. (2012). High Blood caffeine levels in MCI linked to lack of progression to dementia. *J Alzheimers Dis*. 30 (3) : 559-72.

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 9 (7) : 917-24.

Cardona AE, Li M, Liu L, Savarin C, Ransohoff RM. (2008). Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol*. 84 (3) : 587-94.

Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA Jr. (2000). Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain*. 123 (6) : 1092-101.

Carrillo JA, Benitez J. (1996). CYP1A2 activity, gender and smoking, as variables influencing the toxicity of caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 41 (6) : 605-8.

Carter SF, Schöll M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Långström B, Nordberg A. (2012). Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med*. 53 (1) : 37-46.

Casey BJ, Thomas KM, Welsh TF, Badgaiyan RD, Eccard CH, Jennings JR, Crone EA. (2000). Dissociation of response conflict, attentional selection, and expectancy with functional magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (15) : 8728-33.

Cedazo-Mínguez A, Cowburn RF. (2001). Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med*. 5 (3) : 254-66. Review.

Chamberlain SE, Sadowski JH, Teles-Grilo Ruivo LM, Atherton LA, Mellor JR. (2013).

Long-term depression of synaptic kainate receptors reduces excitability by relieving inhibition of the slow afterhyperpolarization. *J Neurosci.* 33 (22) : 9536-45.

Chapman GA, Moores KE, Gohil J, Berkhout TA, Patel L, Green P, Macphee CH, Stewart BR. (2000). The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 392 (3) : 189-95.

Chapuis J, Hansmann F, Gistelinck M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, Geller F, Sottejeau Y, Harold D, Dourlen P, Grenier-Boley B, Kamatani Y, Delepine B, Demiautte F, Zelenika D, Zommer N, Hamdane M, Bellenguez C, Dartigues et al. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry.* 18 (11) : 1225-34.

Charo IF, Ransohoff RM. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354 (6) : 610-21. Review.

Chávez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, Wiltfang J, Serneels L, Karran E, Gijzen H, Schymkowitz J, Rousseau F, Broersen K, De Strooper B. (2012). The mechanism of  $\gamma$ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* 31 (10) : 2261-74.

Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. (2001) Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res.* 902 (2) : 171-7.

Chee MW, Chuah LY, Venkatraman V, Chan WY, Philip P, Dinges DF. (2006). Functional imaging of working memory following normal sleep and after 24 and 35 h of sleep deprivation : Correlations of fronto-parietal activation with performance. *Neuroimage.* 31 (1) : 419-28.

Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 360 (6405) : 674-7.

Chen JF, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, Beilstein MA, Hackett E, Fink JS, Low MJ, Ongini E, Schwarzschild MA. (2001). The role of the D2 dopamine receptor D2R in A2A adenosine receptor A2AR-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (4) : 1970-5.

Chen JF, Pedata F. (2008). Modulation of ischemic brain injury and neuroinflammation by adenosine A2A receptors. *Curr Pharm Des.* 14 (15) : 1490-9.

Chen W, Wang H, Wei H, Gu S, Wei H. (2013). Istradefylline, an adenosine A<sub>2</sub>A receptor antagonist, for patients with Parkinson's Disease: a meta-analysis. *J Neurol Sci.* 324 (1-2) : 21-8.

Cheng D, Noble J, Tang MX, Schupf N, Mayeux R, Luchsinger JA. (2011). Type 2 diabetes and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 31 (6) : 424-30.

Chesser AS, Pritchard SM, Johnson GV. (2013). Tau Clearance Mechanisms and their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Front Neurol.* 4 : 122. Review.

Chung WG, Cha YN. (1997). Oxidation of caffeine to theobromine and theophylline is catalyzed primarily by flavin-containing monooxygenase in liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 235 (3) : 685-8.

Chung WG, Kang JH, Park CS, Cho MH, Cha YN. (2000). Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase activities in Koreans:

determination by caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 67 (3) : 258-66.

Clavaguera F, Grueninger F, Tolnay M. (2013). Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology.* 76 : 9-15.

Clausen A, Xu X, Bi X, Baudry M. Effects of the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-207 in a mouse model of Alzheimer's disease: protection against and interruption of progression of amyloid and tau pathology and cognitive decline. (2012). *J Alzheimers Dis.* 30 (1) : 183-208.

Coelho JE, Rebola N, Fragata I, Ribeiro JA, de Mendonça A, Cunha RA. (2006). Hypoxia-induced desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 138 (4) : 1195-203.

Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. (1997). Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol.* 79 (2) : 163-75.

Colton CA. (2009). Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4 (4) : 399-418.

Connolly JA, Kalnins VI, Cleveland DW, Kirschner MW. (1977). Immunofluorescent staining of cytoplasmic and spindle microtubules in mouse fibroblasts with antibody to tau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (6) : 2437-40.

Coon KD, Myers AJ, Craig DW, Webster JA, Pearson JV, Lince DH, Zismann VL, Beach TG, Leung D, Bryden L, Halperin RF, Marlowe L, Kaleem M, Walker DG, Ravid R, Heward CB, Rogers J, Papassotiropoulos A, Reiman EM, Hardy J, Stephan DA. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* 68 (4) : 613-8.

Corcoran NM, Martin D, Hutter-Paier B, Windisch M, Nguyen T, Nheu L, Sundstrom LE, Costello AJ, Hovens CM. (2010). Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci* 17 (8) : 1025-33.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261 (5123) : 921-3.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 7 (2) : 180-4.

Coria F, Rubio I, Bayón C. (1994). Alzheimer's disease, beta-amyloidosis, and aging. *Rev Neurosci.* 5 (4) : 275-92. Review.

Corrêa JD, Starling D, Teixeira AL, Caramelli P, Silva TA. (2011). Chemokines in CSF of Alzheimer's disease patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 69 (3) : 455-9.

Costello DA, Lyons A, Denieffe S, Browne TC, Cox FF, Lynch MA. (2011). Long term potentiation is impaired in membrane glycoprotein CD200-deficient mice : a role for Toll-like receptor activation. *J Biol Chem.* 286 (40) : 34722-32.

Costenla AR, Diógenes MJ, Canas PM, Rodrigues RJ, Nogueira C, Maroco J, Agostinho PM, Ribeiro JA, Cunha RA, de Mendonça A. (2011). Enhanced role of adenosine A2A receptors in the modulation of LTP in the rat hippocampus upon ageing. *Eur J Neurosci.* 34 (1) : 12-21.

- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 438 (7070) : 1017-21.
- Cowan CM, Chee F, Shepherd D, Mudher A. (2010). Disruption of neuronal function by soluble hyperphosphorylated tau in a *Drosophila* model of tauopathy. *Biochem Soc Trans*. 38 (2) : 564-70.
- Cristóvão-Ferreira S, Vaz SH, Ribeiro JA, Sebastião AM. (2009). Adenosine A2A receptors enhance GABA transport into nerve terminals by restraining PKC inhibition of GAT-1. *J Neurochem*. 109 (2) : 336-47.
- Cristóvão-Ferreira S, Navarro G, Brugarolas M, Pérez-Capote K, Vaz SH, Fattorini G, Conti F, Lluís C, Ribeiro JA, McCormick PJ, Casadó V, Franco R, Sebastião AM. (2013). A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and G i/o proteins modulate GABA transport into astrocytes. *Purinergic Signal* 9 (3) : 433-49.
- Cruchaga C, Kauwe JS, Harari O, Jin SC, Cai Y, Karch CM, Benitez BA, Jeng AT, Skorupa T, Carrell D, Bertelsen S, Bailey M, McKean D, Shulman JM, De Jager PL, Chibnik L, Bennett DA, et al. (2013). GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron*. 78 (2) : 256-68.
- Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, Russell JH, Klein RS. (2011). CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*. 208 (2) : 327-39.
- Cunha RA, Johansson B, Fredholm BB, Ribeiro JA, Sebastião AM. (1995). Adenosine A2A receptors stimulate acetylcholine release from nerve terminals of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 196 (1-2) : 41-4.
- Cunha RA, Johansson B, Constantino MD, Sebastião AM, Fredholm BB. (1996). Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H] CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 353 (3) : 261-71.
- Cunha RA, Ribeiro JA. (2000). Purinergic modulation of (3)H GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology*. 39 (7) : 1156-67.
- Cunha RA, Almeida T, Ribeiro JA. (2001). Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. *J Neurochem*. 76 (2) : 372-82.
- Cunha GM, Canas PM, Melo CS, Hockemeyer J, Muller CE, Oliveira CR, Cunha RA. (2008). Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol* 210 : 776-781
- Cunha RA, Agostinho PM. (2010). Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis*. 20 Suppl 1 : S95-116.
- Currais A, Kato K, Canuet L, Ishii R, Tanaka T, Takeda M, Soriano S (2011) Caffeine modulates tau phosphorylation and affects Akt signaling in postmitotic neurons. *J Mol Neurosci* 43 : 326-332

## D



- Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 138 : 1207–1209
- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. (2007). Caffeine and adenosine A2A receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 203 : 241–245
- Dai SS, Zhou YG, Li W, An JH, Li P, Yang N, Chen XY, Xiong RP, Liu P, Zhao Y et al. (2010). Local glutamate level dictates adenosine A2A receptor regulation of neuroinflammation and traumatic brain injury. *J Neurosci* 30 : 5802–5810
- Davies P. (1986). The genetics of Alzheimer's disease: a review and a discussion of the implications. *Neurobiol Aging*. 7 (6) : 459-66. Review.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watzel A, Vermersch P, Ghzali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 12, 52(6) : 1158-65.
- Depue RA, Collins PF. (1999). Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion. *Behav Brain Sci*. 22 (3) : 491-517 518-69. Review.
- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinlan KM, Cribfield A, Lynch KR, Kipnis J. (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity : a key role for IL-4. *J Exp Med*. 207 (5) : 1067-80.
- Derecki NC, Quinlan KM, Kipnis J. (2011). Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain Behav Immun*. 25 (3) : 379-85.
- Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. (2010) SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol*. 32 (2) : 157-71.
- De Mendonça A, Ribeiro JA. (2000). Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A1 receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *Neurosci Lett*. 291 (2) : 81-4.
- De Strooper B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*. 38 (1) : 9-12. Review.
- Dias RB, Ribeiro JA, Sebastião AM. (2012). Enhancement of AMPA currents and GluR1 membrane expression through PKA-coupled adenosine A2A receptors. *Hippocampus*. 22 (2) : 276-91.
- DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D. (2001). Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 22 (6) : 1007-12.
- Dickerson BC, Wolk DA, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2013). Biomarker-based prediction of progression in MCI: Comparison of AD signature and hippocampal volume with spinal fluid amyloid- $\beta$  and tau. *Front Aging Neurosci*. 5:55.
- Di Filippo M, Chiasserini D, Gardoni F, Viviani B, Tozzi A, Giampà C, Costa C, Tantucci M, Zianni E, Boraso M, Siliquini S, de Iure A, Ghiglieri V, Colcelli E, Baker D, Sarchielli P, Fusco FR, Di Luca M, Calabresi P. (2013). Effects of central and peripheral inflammation on

hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Dis.* 52 : 229-36.

Dik MG, Jonker C, Bouter LM, Geerlings MI, van Kamp GJ, Deeg DJ. (2000). APOE-epsilon4 is associated with memory decline in cognitively impaired elderly. *Neurology.* 54 (7) : 1492-7.

Diogenes MJ, Fernandes CC, Sebastiao AM, Ribeiro JA. (2004). Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J Neurosci* 24 : 2905–2913

Diserbo M, Agin A, Lamproglou I, Mauris J, Staali F, Multon E, Amourette C. (2002). Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. *Can J Physiol Pharmacol.* 80 (7) : 670-8.

Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science.* 22, 319 (5866) : 1086-9.

Doherty GH. (2011). Obesity and the ageing brain: could leptin play a role in neurodegeneration? *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2011 : 708154.

Dong Z, Bai Y, Wu X, Li H, Gong B, Howland JG, Huang Y, He W, Li T, Wang YT. (2013). Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology.* 64 : 65-73.

Dorothee G, Aucouturier P. (2011). Adaptive immunity to A $\beta$  amyloid peptide in Alzheimer's disease: lessons and perspectives. *Med Sci (Paris).* 27 (11) : 938-40.

Drapeau C, Hamel-Hébert I, Robillard R, Selmaoui B, Filipini D, Carrier J. (2006). Challenging sleep in aging: the effects of 200 mg of caffeine during the evening in young and middle-aged moderate caffeine consumers. *J Sleep Res.* 15 (2) : 133-41.

Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 3 (10) : 1141-54

Duan RS, Yang X, Chen ZG, Lu MO, Morris C, Winblad B, Zhu J. (2008). Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP (swe) transgenic mice. *Neurochem Res.* 33 (6) : 1085-9

Dubey M, Chaudhury P, Kabiru H, Shea TB. (2008). 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.* 65 (2) : 89-99.

Dunwiddie TV, Diao L. (1994). Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther.* 268 (2) : 537-45.

Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci.* 17 (20) : 7673-82.

Dunwiddie TV, Masino SA. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24 : 31-55. Review.

Duyckaerts C, Bennefib M, Grignon Y, Uchihara T, He Y, Piette F, Hauw JJ. (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging.* 18 (3) : 267-73.

## E

Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ. (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis.* 32 (3) : 412-9.

Ekinci FJ, Shea TB. (2000). Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol.* 20 (4) : 497-508.

El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med.* 13 (4) : 432-8.

El Yacoubi M, Ledent C, Ménard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. (2000). The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *Br J Pharmacol.* 129 (7) : 1465-73.

Engelhardt B, Ransohoff RM. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26 (9) : 485-95.

Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. (2009). Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* (16) : 85-91

## F

Fang F, Lue LF, Yan S, Xu H, Luddy JS, Chen D, Walker DG, Stern DM, Yan S, Schmidt AM, Chen JX, Yan SS. (2010). RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A $\beta$  accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 24 (4) : 1043-55.

Farrall AJ, Wardlaw JM. (2009). Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 30 (3) : 337-52.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM. (1997). 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.* 278 (16) : 1349-56.

Fei M, Yan Ping Z, Ru Juan M, Ning Ning L, Lin G. (2013). Risk factors for dementia with type 2 diabetes mellitus among elderly people in China. *Age Ageing.* 42 (3) : 398-400.

Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. (2013). Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem.* 126 (2) : 261-73.

Ferré S. (1997). Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 133 (2) : 107-20. Review.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M. (2005). Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 366 (9503) : 2112-7.

Fiebich BL, Biber K, Lieb K, van Calker D, Berger M, Bauer J, Gebicke-Haerter PJ. (1996).

Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Glia* 18 : 152–160

Finch CE, Sapolsky RM. (1999). The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol Aging*. 20 (4) : 407-28. Review.

Fisher Y, Nemirovsky A, Baron R, Monsonego A. (2010). T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 5 (5) : e10830.

Fisher Y, Nemirovsky A, Baron R, Monsonego A. (2011). Dendritic cells regulate amyloid- $\beta$ -specific T-cell entry into the brain: the role of perivascular amyloid- $\beta$ . *J Alzheimers Dis*. 27 (1) : 99-111.

Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*. 61 (7-8) : 857-72. Review.

Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 162 (1) : 1-11.

Fonseca AC, Resende R, Oliveira CR, Pereira CM. (2010). Cholesterol and statins in Alzheimer's disease: current controversies. *Exp Neurol*. 223 (2) : 282-93.

Fontinha BM, Diogenes MJ, Ribeiro JA, Sebastiao AM. (2008). Enhancement of long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor requires adenosine A2A receptor activation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology* 54 : 924–933.

Foucher JR, Otzenberger H, Gounot D. (2004). Where arousal meets attention: a simultaneous fMRI and EEG recording study. *Neuroimage*. 22 (2) : 688-97.

Frary CD, Johnson RK, Wang MQ. (2005). Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J Am Diet Assoc*. 105 (1) : 110-3.

Fredholm, B.B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E.. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83-133.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. (2001). *Pharmacol Rev.* 53 (4) : 527-52. Review.

Frenguelli BG, Wigmore G, Llaudet E, Dale N. (2007). Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. *J Neurochem* 101 : 1400–1413

Fu H, Liu B, Frost JL, Hong S, Jin M, Ostaszewski B, Shankar GM, Costantino IM, Carroll MC, Mayadas TN, Lemere CA. (2012). Complement component C3 and complement receptor type 3 contribute to the phagocytosis and clearance of fibrillar A $\beta$  by microglia. *Glia*. 60 (6) : 993-1003.

## G

Galimberti D, Schoonenboom N, Scarpini E, Scheltens P; Dutch-Italian Alzheimer Research Group. (2003). Chemokines in serum and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol*. 53 (4) : 547-8.

Galimberti D, Schoonenboom N, Scheltens P, Fenoglio C, Venturelli E, Pijnenburg YA, Bresolin N, Scarpini E. (2006). Intrathecal chemokine levels in Alzheimer disease and

frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*. 66 (1) : 146-7.

Garwood CJ, Cooper JD, Hanger DP, Noble W. (2010). Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Front Psychiatry*. 1:136.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 63 (2) : 168-74.

Ge Y, Dong Z, Bagot RC, Howland JG, Phillips AG, Wong TP, Wang YT. (2010). Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (38) : 16697-702.

Geiger JD, Nagy JI. (1986). Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord. *J Neurosci*. 6 (9) : 2707-14.

Gendron TF, Petrucelli L. (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener*. Mar 11, 4 : 13.

Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Bullido MJ, Engelborghs S, De Deyn P, Berr C, Pasquier F, Dubois B, Tognoni G, Fiévet N, Brouwers N, Bettens K, Arosio B, Coto E, Del Zompo M, Mateo I, Epelbaum J, Frank-Garcia A, Helisalmi S, Porcellini E, Pilotto A, Forti P, Ferri R, Scarpini E, Siciliano G, Solfrizzi V, Sorbi S, Spalletta G, Valdivieso F, Vepsäläinen S, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Hanon O, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Licastro F, Soininen H, Dartigues JF, Kamboh MI, Van Broeckhoven C, Lambert JC, Amouyel P, Campion D. (2011). APOE and Alzheimer disease : a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. 16 (9) : 903-7.

Gheorghiu M, Enciu AM, Popescu BO, Gheorghiu E. (2013). Functional and Molecular Characterization of the Effect of Amyloid- $\beta$ 42 on an in vitro Epithelial Barrier Model. *J Alzheimers Dis*. (in press).

Ghosh S, Wu MD, Shaftel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, O'Banion MK. (2013). Sustained interleukin-1 $\beta$  overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J Neurosci*. 33 (11) : 5053-64.

Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM; AN1792(QS-21)-201 Study Team. (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 64 (9) : 1553-62.

Gimenez-Llort L, Schiffmann SN, Schmidt T, Canela L, Camon L, Wassholm M, Canals M, Terasmaa A, Fernandez-Teruel A, Tobena A et al. (2007). Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem* 87 : 42-56

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci*. 7 : 45

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140 (6) : 918-34.

Glenner GG, Wong CW. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 16, 120 (3) : 885-90.

Glenner GG, Wong CW. (1984b). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a

unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122 (3) : 1131-5.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349 (6311) : 704-6.

Goedert M, Jakes R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 9 (13) : 4225-30.

Goldgaber D, Lerman MI, McBride WO, Saffiotti U, Gajdusek DC. (1987). Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging. *J Neural Transm Suppl*. 24 : 23-8.

Gomes CV, Kaster MP, Tomé AR, Agostinho PM, Cunha RA. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 1808 (5) : 1380-99.

Gorlovoy P, Larionov S, Pham TT, Neumann H. (2009). Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. *FASEB J*. 23 (8) : 2502-13.

Gottselig JM, Adam M, Rétey JV, Khatami R, Achermann P, Landolt HP. (2006). Random number generation during sleep deprivation: effects of caffeine on response maintenance and stereotypy. *J Sleep Res*. 15 (1) : 31-40.

Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J*. 14 (7) : 1304-13.

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Aβ<sub>42</sub> fibrils. *Science*. 293 (5534) : 1491-5.

Gouder N, Scheurer L, Fritschy JM, Boison D. (2004). Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci* 24 : 692–701

Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. (1997). Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol*. 74 (1-2) : 35-44.

Gousset K, Schiff E, Langevin C, Marijanovic Z, Caputo A, Browman DT, Chenouard N, de Chaumont F, Martino A, Enninga J, Olivo-Marin JC, Männel D, Zurzolo C. (2009). Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat Cell Biol*. 11 (3) : 328-36.

Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett*. 585 (23) : 3798-805.

Groenewegen HJ, Trimble M. (2007). The ventral striatum as an interface between the limbic and motor systems. *CNS Spectr*. 12 (12) : 887-92.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83 (13) : 4913-7.

Gu Y, Oyama F, Ihara Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem*. 67 (3) : 1235-44.

Gu J, Congdon EE, Sigurdsson EM. (2013). Two novel tau antibodies targeting the 396/404 region are primarily taken up by neurons and reduce tau pathology. *J Biol Chem.* (in press).

Gui L, Duan W, Tian H, Li C, Zhu J, Chen JF, Zheng J. (2009). Adenosine A2A receptor deficiency reduces striatal glutamate outflow and attenuates brain injury induced by transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 1297 : 185-93

Gupta U. (1991). Differential effects of caffeine on free recall after semantic and rhyming tasks in high and low impulsives. *Psychopharmacology (Berl)* 105, 137-140.

Gureje O, Ogunniyi A, Baiyewu O, Price B, Unverzagt FW, Evans RM, Smith-Gamble V, Lane KA, Gao S, Hall KS, Hendrie HC, Murrell JR. (2006). APOE epsilon4 is not associated with Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Ann Neurol.* 59 (1) : 182-5.

Guzik-Kornacka A, Sliwa A, Plucinska G, Lukasiuk K. (2011). Status epilepticus evokes prolonged increase in the expression of CCL3 and CCL4 mRNA and protein in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 71 (2) : 193-207.

## H

Hanger DP, Anderton BH, Noble W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 15 (3) : 112-9.

Hanisch UK, Kettenmann H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10 (11) : 1387-94. Review.

Haskó G, Pacher P. (2008). A2A receptors in inflammation and injury : lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol.* 83 (3) : 447-55. Review.

Hardy JA, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256 (5054) : 184-5. Review.

Harland BF. (2000). Caffeine and nutrition. *Nutrition.* 16 (7-8) : 522-6. Review

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088-1093.

Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (18) : 10896-901.

Hatip FF, Suenaga M, Yamada T, Matsunaga Y.(2009). Reversal of temperature-induced conformational changes in the amyloid-beta peptide, Abeta40, by the beta-sheet breaker peptides 16-23 and 17-24. *Br J Pharmacol.* 158 (4) : 1165-72.

Hawkins BT, Davis TP. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57 (2) : 173-85. Review.

Hayashi Y, Ishibashi H, Hashimoto K, Nakanishi H. (2006). Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia.* 53 (6) : 660-8.

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C, O'Banion K, Klockgether T, Van Leuven F, Landreth GE. (2005). Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42

levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*. 128 (6) : 1442-53.

Henríquez JP, Cross D, Vial C, Maccioni RB. (1995). Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct*. 13 (4) : 239-50.

Herber DL, Roth LM, Wilson D, Wilson N, Mason JE, Morgan D, Gordon MN. (2004). Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Exp Neurol*. 190 (1) : 245-53.

Herber DL, Mercer M, Roth LM, Symmonds K, Maloney J, Wilson N, Freeman MJ, Morgan D, Gordon MN. (2007). Microglial activation is required for Abeta clearance after intracranial injection of lipopolysaccharide in APP transgenic mice. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2 (2) : 222-31.

Herx LM, Rivest S, Yong VW. (2000). Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol*. 165 (4) : 2232-9.

Herx LM, Yong VW. (2001). Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60 (10) : 961-71.

Hewlett P, Smith A. (2007). Effects of repeated doses of caffeine on performance and alertness : new data and secondary analyses. *Hum Psychopharmacol*. 22 (6) : 339-50.

Hindley S, Herman MA, Rathbone MP (1994) Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extra-cellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist. *J Neurosci Res* 38 : 399–406

Higgins GA, Grzelak ME, Pond AJ, Cohen-Williams ME, Hodgson RA, Varty GB. (2007). The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2A receptors. *Behav Brain Res*. 185 (1) : 32-42.

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 290 (5497) : 1768-71.

Hooli BV, Mohapatra G, Mattheisen M, Parrado AR, Roehr JT, Shen Y, Gusella JF, Moir R, Saunders AJ, Lange C, Tanzi RE, Bertram L. (2012). Role of common and rare APP DNA sequence variants in Alzheimer disease. *Neurology*. 78 (16) : 1250-7.

Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI. (2004). Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 24 (36) : 7895-902.

Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, Hayaishi O. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci*. 8 (7) : 858-9.

Huang ZL, Urade Y, Hayaishi O. (2011). The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem*. 11 (8) : 1047-57. Review.

Huber A, Padrun V, Déglon N, Aebischer P, Möhler H, Boison D. (2001). Grafts of adenosine-releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 7611–7616

Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. (2011). Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull*. 34 (12) : 1849-55.



## I

Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J. Neurosci.* 33, 1024-37.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B. (1986). Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2 (8504) : 421-6.

Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM. (2001). Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol.* 158 (2) : 555-62.

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H. (1988). Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neurosci Lett.* 91 (3) : 259-64.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng, BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 142 (3) : 387-97.

## J

Jacewicz M, Czapski GA, Katkowska I, Strosznajder RP (2009). Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia Neuropathol.* 47 (4) : 321-8.

Jacobson KA, von Lubitz DK, Daly JW, Fredholm BB. (1996). Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. *Trends Pharmacol Sci* 17:108–113

Jagust W, Harvey D, Mungas D, Haan M. (2005). Central obesity and the aging brain. *Arch Neurol* 62 (10) : 1545-8.

James JE, Rogers PJ. (2005). Effects of caffeine on performance and mood: withdrawal reversal is the most plausible explanation. *Psychopharmacology (Berl)*. 182 (1) : 1-8.

Jarmuła A, Stępkowski D. (2013). The  $\beta$ -sheet breakers and  $\pi$ -stacking. *J Pept Sci.* 19 (6) : 345-9.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 24, 695 : 144-8. Review.

Jarvis MJ. (1993). Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance. *Psychopharmacology (Berl)* 110, 45-52.

de Jong EK, Dijkstra IM, Hensens M, Brouwer N, van Amerongen M, Liem RS, Boddeke HW, Biber K. (2005). Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J Neurosci.* 25 (33) : 7548-57.

Jenkins SM, Johnson GV. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport.* 9 (1) : 67-71.

Jiang C, Cui K, Wang J, He Y. (2011). Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *Int Immunopharmacol.* 11 (11) : 1925-31.

John GR, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF. (2004).

Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci.* 24 (11) : 2837-45.

Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. (2013). Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain.* 136 (1) : 28-42.

Johnson-Kozlow M, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E, Morton D. (2002). Coffee consumption and cognitive function among older adults. *Am J Epidemiol.* 156 (9) : 842-50.

Jones RS, Minogue AM, Connor TJ, Lynch MA. (2013). Amyloid- $\beta$ -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8 (1) : 301-11.

## K

Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Saykin AJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun G, Baldwin C, Logue MW, Buross J, Farrer L, Pericak-Vance MA, Haines JL, Sweet RA, Ganguli M, Feingold E, Dekosky ST, Lopez OL, Barmada MN (2012). Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2 : e117.

Kanno T, Nishizaki T. (2012). A2a adenosine receptor mediates PKA-dependent glutamate release from synaptic-like vesicles and Ca(2+) efflux from an IP(3)- and ryanodine-insensitive intracellular calcium store in astrocytes. *Cell Physiol Biochem.* 30 (6) : 1398-412.

Karran E, Mercken M, De Strooper B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 10 (9) : 698-712.

Katsuki H, Okawara M, Shibata H, Kume T, Akaike A. (2006). Nitric oxide-producing microglia mediate thrombin-induced degeneration of dopaminergic neurons in rat midbrain slice culture. *J Neurochem.* 97 (5) : 1232-42.

Kawai T, Akira S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol.* 19 (1) : 24-32. Review.

Keller L, Welander H, Chiang HH, Tjernberg LO, Nennesmo I, Wallin AK, Graff C. (2010). The PSEN1 I143T mutation in a Swedish family with Alzheimer's disease: clinical report and quantification of A $\beta$  in different brain regions. *Eur J Hum Genet.* 18 (11) : 1202-8.

Kellner A, Matschke J, Bernreuther C, Moch H, Ferrer I, Glatzel M. (2009). Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden. *Ann Neurol.* 65 (1) : 24-31.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47 : 89-116. Review.

Khandelwal PJ, Dumanis SB, Herman AM, Rebeck GW, Moussa CE. (2012). Wild type and P301L mutant Tau promote neuro-inflammation and  $\alpha$ -Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models. *Mol Cell Neurosci.* 49 (1) : 44-53.

Kierdorf K, Prinz M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci.* 7 : 44.

Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T. (2013). MicroRNAs in Plasma and Cerebrospinal Fluid as Potential Markers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* (in press).

- Kim do Y, Hao J, Liu R, Turner G, Shi FD, Rho JM. (2012). Inflammation-mediated memory dysfunction and effects of a ketogenic diet in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One*. 7 (5) : e35476.
- Kim J, Lee S, Shim J, Kim HW, Kim J, Jang YJ, Yang H, Park J, Choi SH, Yoon JH, Lee KW, Lee HJ. (2012b). Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochem Int*. 60 (5) : 466-74.
- Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. (2004). T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (21) : 8180-5.
- Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. (2012). Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol*. 12 (9) : 663-9.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. (2005). Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 25 (39) : 8843-53.
- Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM. (2011). Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal  $\beta$ -catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol*. 187 (12) : 6539-49.
- Kivipelto M, Ngandu T, Fratiglioni L, Viitanen M, K reholt I, Winblad B, Helkala EL, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A. (2005). Obesity and vascular risk factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 62 (10) : 1556-60.
- Klaassen EB, de Groot RH, Evers EA, Snel J, Veerman EC, Ligtenberg AJ, Jolles J, Veltman DJ. (2013). The effect of caffeine on working memory load-related brain activation in middle-aged males. *Neuropharmacology*. 64 : 160-7.
- Klein RL, Dayton RD, Diaczynsky CG, Wang DB. (2010). Pronounced microgliosis and neurodegeneration in aged rats after tau gene transfer. *Neurobiol Aging*. 31 (12) : 2091-102
- Ko JH, Ptito A, Monchi O, Cho SS, Van Eimeren T, Pellecchia G, Ballanger B, Rusjan P, Houle S, Strafella AP. (2009). Increased dopamine release in the right anterior cingulate cortex during the performance of a sorting task: a [11C]FLB 457 PET study. *Neuroimage*. 46 (2) : 516-21.
- Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci*. 25 (36) : 8240-9.
- Kohman RA, Bhattacharya TK, Kilby C, Bucko P, Rhodes JS. (2013). Effects of minocycline on spatial learning, hippocampal neurogenesis and microglia in aged and adult mice. *Behav Brain Res*. 242 : 17-24.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*. 10 (7) : 719-26.
- Kook SY, Hong HS, Moon M, Ha CM, Chang S, Mook-Jung I. (2012). A $\beta$ <sub>1-42</sub>-RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca<sup>2+</sup>-calcineurin signaling. *J Neurosci*. 32 (26) : 8845-54.

- Kopke, E., Tung, Y.C., Shaikh, S., Alonso, A.C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268, 24374-24384.
- Koppelstaetter F, Poeppel TD, Siedentopf CM, Ischebeck A, Verius M, Haala I, Mottaghy FM, Rhomberg P, Golaszewski S, Gotwald T, Lorenz IH, Kolbitsch C, Felber S, Krause BJ (2008). Does caffeine modulate verbal working memory processes? An fMRI study. *Neuroimage*. 39 (1) : 492-9.
- Kovac A, Zilka N, Kazmerova Z, Cente M, Zilkova M, Novak M. (2011). Misfolded truncated protein  $\tau$  induces innate immune response via MAPK pathway. *J Immunol*. 187 (5) : 2732-9.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, Cirrito JR, Holtzman DM, Kim J, Pekny M, Lee JM. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J*. 27 (1) : 187-98.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.K., and Yen, S.H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* 597, 209-219.

## L

- LaFerla FM, Green KN, Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 8 (7) : 499-509. Review.
- Lai MT, Chen E, Crouthamel MC, DiMuzio-Mower J, Xu M, Huang Q, Price E, Register RB, Shi XP, Donoviel DB, Bernstein A, Hazuda D, Gardell SJ, Li YM. (2003). Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities. *J Biol Chem*. 278 (25) : 22475-81.
- Lai CY, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Chang CJ, Liao SL, Su HL, Chen CJ. (2012). Endothelial Japanese encephalitis virus infection enhances migration and adhesion of leukocytes to brain microvascular endothelia via MEK-dependent expression of ICAM1 and the CINC and RANTES chemokines. *J Neurochem*. 123 (2) : 250-61.
- Lai W, Wu J, Zou X, Xie J, Zhang L, Zhao X, Zhao M, Wang Q, Ji J. (2013). Secretome analyses of A $\beta$ (1-42) stimulated hippocampal astrocytes reveal that CXCL10 is involved in astrocyte migration. *J Proteome Res*. 12 (2) : 832-43.
- Lally JS, Jain SS, Han XX, Snook LA, Glatz JF, Luiken JJ, McFarlan J, Holloway GP, Bonen A. (2012). Caffeine-stimulated fatty acid oxidation is blunted in CD36 null mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 205 (1) : 71-81.
- Lambert, J.C., Heath, S., Even, G., Champion, D., Slegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1094-1099.
- Landolt HP, Werth E, Borbély AA, Dijk DJ. (1995). Caffeine intake (200 mg) in the morning affects human sleep and EEG power spectra at night. *Brain Res*. 675 (1-2) : 67-74.
- Landrum RE, Meliska CJ, Loke WH. (1988). Effects of caffeine and task experience on task performance. *Psychologia : Ann Internat J Psychol* 31, 91-97.
- Lane RM, Farlow MR. (2005). Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 46 (5) : 949-68.

- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, Jackson GR, Kaye R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep.* 2 : 700.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 39 (1) : 151-70.
- Lazarus M, Shen HY, Cherasse Y, Qu WM, Huang ZL, Bass CE, Winsky-Sommerer R, Semba K, Fredholm BB, Boison D, Hayaishi O, Urade Y, Chen JF. (2011). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 31 (27) : 10067-75.
- Leal MC, Dorfman VB, Gamba AF, Frangione B, Wisniewski T, Castaño EM, Sigurdsson EM, Morelli L. (2006). Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65 (10) : 976-87.
- Leboucher A, Laurent C, Fernandez-Gomez FJ, Burnouf S, Troquier L, Eddarkaoui S, Demeyer D, Caillierez R, Zommer N, Vallez E, Bantubungi K, Breton C, Pigny P, Buée-Scherrer V, Staels B, Hamdane M, Tailleux A, Buée L, Blum D. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on  $\tau$  pathology are independent of insulin resistance in  $\tau$  transgenic mice. *Diabetes.* 62 (5) : 1681-8.
- Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, Hübinger G, Obermeier A, Sahagún H, Monse B, Seneci P, Lewis J, Eriksen J, Zehr C, Yue M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Roder HM. (2006). An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (25) : 9673-8.
- Le Freche H, Brouillette J, Fernandez-Gomez FJ, Patin P, Caillierez R, Zommer N, Sergeant N, Buée-Scherrer V, Lebuffe G, Blum D, Buée L. (2012). Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative cognitive impairment. *Anesthesiology.* 116 (4) : 779-87.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature.* 388 (6643) : 674-8.
- Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. (1993). Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol.* 150 (7) : 2659-67.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci.* 111 (21) : 3167-77.
- Lee DC, Rizer J, Selenica ML, Reid P, Kraft C, Johnson A, Blair L, Gordon MN, Dickey CA, Morgan D. (2010). LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J Neuroinflammation.* 7 : 56.
- Lee M. (2013). Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* 14 (1) : 21-32. Review.
- Leite MR, Wilhelm EA, Jesse CR, Brandão R, Nogueira CW. (2011). Protective effect of caffeine and a selective A2A receptor antagonist on impairment of memory and oxidative stress of aged rats. *Exp Gerontol.* 46 (4) : 309-15.
- León DA, Castillo CA, Albasanz JL, Martín M. (2009). Reduced expression and desensitization of adenosine A1 receptor/adenylyl cyclase pathway after chronic (-) N6-phenylisopropyladenosine intake during pregnancy. *Neuroscience.* 163 (2) : 524-32.

de Leon J, Diaz FJ, Rogers T, Browne D, Dinsmore L, Ghosheh OH, Dwoskin LP, Crooks PA. (2003). A pilot study of plasma caffeine concentrations in a US sample of smoker and nonsmoker volunteers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27 (1) : 165-71.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25 (4) : 402-5.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293 (5534) : 1487-91.

Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, Kuo LH, Wolfe MS. (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem*. 279 (47) : 49523-32.

Li XX, Nomura T, Aihara H, Nishizaki T. (2001). Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci*. 68 (12) : 1343-50.

Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci*. 23 (5) : 1605-11.

Li YQ, Chen P, Jain V, Reilly RM, Wong CS. (2004). Early radiation-induced endothelial cell loss and blood-spinal cord barrier breakdown in the rat spinal cord. *Radiat Res*. 161 (2) : 143-52.

Li T, Paudel HK. (2006). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*. 45 (10) : 3125-33.

Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol*. 113 (5) : 501-11.

Li W, Dai S, An J, Li X, Chen X, Xiong R, Liu P, Wang H, Zhao Y, Zhu M, Liu X, Zhu P, Chen JF, Zhou Y. (2008). Chronic but not acute treatment with caffeine attenuates traumatic brain injury in the mouse cortical impact model. *Neuroscience* 151 : 1198-1207

Li M, Shang DS, Zhao WD, Tian L, Li B, Fang WG, Zhu L, Man SM, Chen YH. (2009). Amyloid beta interaction with receptor for advanced glycation end products up-regulates brain endothelial CCR5 expression and promotes T cells crossing the blood-brain barrier. *J Immunol*. 182 (9) : 5778-88.

Li FJ, Shen L, Ji HF. (2012). Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 31 (2) : 253-8.

Lieberman HR, Wurtman RJ, Emde GG, Roberts C, Coviella IL. (1987). The effects of low doses of caffeine on human performance and mood. *Psychopharmacology (Berl)*. 92 (3) : 308-12.

Lieberman HR, Tharion WJ, Shukitt-Hale B, Speckman KL, Tulley R. (2002). Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. *Sea-Air-Land. Psychopharmacology (Berl)*. 164 (3) : 250-61.

- Linden J. (2001). Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41 : 775-87. Review.
- Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American journal of epidemiology* (156) : 445-53.
- Lindskog M, Svenningsson P, Pozzi L, Kim Y, Fienberg AA, Bibb JA, Fredholm BB, Nairn AC, Greengard P, Fisone G. (2002). Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. *Nature.* 418 (6899) : 774-8.
- Liraz O, Boehm-Cagan A, Michaelson DM. (2013). ApoE4 induces A $\beta$ 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. *Mol Neurodegener.* 8 : 16.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (29) : 10804-9.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 22 (8) : 1942-50.
- Liu YJ, Guo DW, Tian L, Shang DS, Zhao WD, Li B, Fang WG, Zhu L, Chen YH. (2010). Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial TNF-alpha-dependent. *Neurobiol Aging.* 31 (2) : 175-88.
- Liu W, Tang Y, Feng J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.* 89 (5-6) : 141-6.
- Liu X, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H. (2012). Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience.* 216 : 133-42.
- Lloyd HG, Lindström K, Fredholm BB. (1993). Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem Int.* 23 (2) : 173-85.
- Lo RY, Jagust WJ (2013). For the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Effect of Cognitive Reserve Markers on Alzheimer Pathologic Progression. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*
- Lockhart A, Lamb JR, Osredkar T, Sue LI, Joyce JN, Ye L, Libri V, Leppert D, Beach TG. (2007). PIB is a non-specific imaging marker of amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide-related cerebral amyloidosis. *Brain.* 130(10) : 2607-15.
- Loke WH, Goh WD. (1992). The effect of caffeine-user on a visual information processing task. *Human Psychopharmacol Clin Exp* 7, 175-181.
- Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA. (2002). Adenosine A2A receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A1 receptor inhibition. *Neuroscience.* 112 (2) : 319-29.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (21) : 8422-6
- Lorist MM, Snel J, Kok A, Mulder G. (1994). Influence of caffeine on selective attention in well-rested and fatigued subjects. *Psychophysiology.* 31 (6) : 525-34.

Lourida I, Soni M, Thompson-Coon J, Purandare N, Lang IA, Ukoumunne OC, Llewellyn DJ. (2013). Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review. *Epidemiology*. 24 (4) : 479-89.

Lu Y, He HJ, Zhou J, Miao JY, Lu J, He YG, Pan R, Wei Y, Liu Y, He RQ. (2013). Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J Alzheimer's Dis*. 37 (3) : 551-63.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. (2003). Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 60 (2) : 203-8.

Luo MH, Leski ML, Andreadis A. (2004). Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J Cell Biochem*. 1, 91 (5) : 880-95.

## M

MacDonald AW 3rd, Cohen JD, Stenger VA, Carter CS. (2000). Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. *Science*. 288 (5472) : 1835-8.

McCall AL, Millington WR, Wurtman RJ. (1982). Blood-brain barrier transport of caffeine : dose-related restriction of adenine transport. *Life Sci*. 31 (24) : 2709-15.

Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. (2001). Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol*. 167 (9) : 5004-10.

Maia L, de Mendonca A. (2002). Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* (9) : 377-82 .

Man SM, Ma YR, Shang DS, Zhao WD, Li B, Guo DW, Fang WG, Zhu L, Chen YH. (2007). Peripheral T cells overexpress MIP-1alpha to enhance its transendothelial migration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 28 (4) : 485-96.

Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging*. 24 (8) : 1079-85.

Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE. (2009). Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci*. 29 (13) : 4252-62.

Martin L, Latypova X, Terro F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 58 (4) : 458-71.

Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. (2013a). Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 12 (1) : 289-309.

Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Terro F. (2013b). Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res Rev*. 12(1) : 39-49.

Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. (2001). *J Neurosci*. 21 (18) : 7046-52.

Matos M, Augusto E, Santos-Rodrigues AD, Schwarzschild MA, Chen JF, Cunha RA, Agostinho P. (2012). Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured



astrocytes and gliosomes. *Glia*. 60 (5) : 702-16.

Matousek SB, Ghosh S, Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, O'Banion MK. (2012). Chronic IL-1 $\beta$ -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*. 7 (1) : 156-64.

Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T. (2011). Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study. *Neurology*. 77 (11) : 1068-75.

Maurer K, Volk S, Gerbaldo H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*. 24, 349 (9064) : 1546-9.

McCann MJ, O'Callaghan JP, Martin PM, Bertram T, Streit WJ. (1996). Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyl tin-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 72 (1) : 273-81.

McGuinness B, Passmore P. (2010). Can statins prevent or help treat Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 20 (3) : 925-33.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 34 (7) : 939-44.

McMillan P, Korvatska E, Poorkaj P, Evstafjeva Z, Robinson L, Greenup L, Leverenz J, Schellenberg GD, D'Souza I. (2008). Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J Comp Neurol*. 511 (6) : 788-803.

McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP. (1991). The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron*. 7 (1) : 17-25.

Mdzinarishvili A, Sumbria R, Lang D, Klein J. (2012). Ginkgo extract EGb761 confers neuroprotection by reduction of glutamate release in ischemic brain. *J Pharm Pharm Sci*. 15 (1) : 94-102.

Meng JZ, Guo LW, Cheng H, Chen YJ, Fang L, Qi M, Jia ZY, Mohammed W, Hong XN. (2012). Correlation between cognitive function and the association fibers in patients with Alzheimer's disease using diffusion tensor imaging. *J Clin Neurosci*. 19 (12) : 1659-63.

Mielke JG, Wang YT. (2005). Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABA receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J Neurochem*. 92 (1) : 103-13.

Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Brück W, Priller J, Prinz M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*. 10 (12) : 1544-53.

Milham MP, Banich MT. (2005). Anterior cingulate cortex: an fMRI analysis of conflict specificity and functional differentiation. *Hum Brain Mapp*. 25 (3) : 328-35.

Mills JH, Thompson LF, Mueller C, Waickman AT, Jalkanen S, Niemela J, Airas L, Bynoe MS. (2008). CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (27) : 9325-30.

Mills JH, Kim DG, Krenz A, Chen JF, Bynoe MS. (2012a). A2A adenosine receptor signaling

- in lymphocytes and the central nervous system regulates inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 188 (11) : 5713-22.
- Mills JH, Alabanza LM, Mahamed DA, Bynoe MS. (2012b). Extracellular adenosine signaling induces CX3CL1 expression in the brain to promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 9 : 193.
- Min SS, Quan HY, Ma J, Han JS, Jeon BH, Seol GH. (2009). Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area. *Neurosci Lett.* 456 (1) : 20-4.
- Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K et al. (2013). SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One.* 2013;8(4):e58618.
- Miyata Y, Hoshi M, Nishida E, Minami Y, Sakai H. (1986). Binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70-kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin. *J Biol Chem.* 261 (28) : 13026-30
- Mizuno T. (2012). The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012 : 737846.
- Mizuno Y, Kondo T (2013) Japanese Istradefylline Study Group. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28 (8) : 1138-41.
- Mocanu MM, Nissen A, Eckermann K, Khlistunova I, Biernat J, Drexler D, Petrova O, Schonig K, Bujard H, Mandelkow E, et al. (2008). The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *J Neurosci* 28, 737-748.
- Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, García-Sierra F. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol.* 89 (2) : 81-90.
- Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino M, Williams S. (2013) Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (in press)
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, Budson AE, Sperling R, Selkoe DJ, Weiner HL. (2003). Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 112 (3) : 415-22.
- Monsonogo A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, Fisher Y, Owens T, Weiner HL. (2006). Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103 (13) : 5048-53.
- Monsonogo A, Nemirovsky A, Harpaz I. (2013). CD4 T cells in immunity and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Immunology.* 139 (4) : 438-46.
- Moreira RO, Campos SC, Soldera AL. (2013). Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: from physiopathology to treatment implications. *Diabetes Metab Res Rev.* (in press).
- Morsch R, Simon W, Coleman PD. Neurons may live for decades with neurofibrillary

tangles. (1999). *J Neuropathol Exp Neurol.* 58 (2) : 188-97.

Mrak RE, Griffin WS (2005). Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 8 (4) : 369-75.

Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T. (2011). SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid  $\beta$  protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 286 (52) : 44557-68.

Mustroph ML, King MA, Klein RL, Ramirez JJ. (2012). Adult-onset focal expression of mutated human tau in the hippocampus impairs spatial working memory of rats. *Behav Brain Res.* 233 (1) : 141-8.

## N

Nadler Y, Alexandrovich A, Grigoriadis N, Hartmann T, Rao KS, Shohami E, Stein R. (2008). Increased expression of the gamma-secretase components presenilin-1 and nicastrin in activated astrocytes and microglia following traumatic brain injury. *Glia.* 56 (5) : 552-67.

Napoli I, Neumann H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience.* 158 (3) : 1030-8.

Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N et al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 43 (5) : 436-41.

Nehlig A. (2010). Is caffeine a cognitive enhancer? *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 1 : S85-94

Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. (2009). Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain.* 132 (2) : 288-95.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308 (5726) : 1314-8.

## O

Ohnishi T, Tomita N, Sato-Nakagawa T, Matsui T, Maruyama M, Niwa K, Arai H, Sasaki H. (2004). Effects of brain-penetrating ACE inhibitors on Alzheimer disease progression. *Neurology.* 63 (7) : 1324-5.

Ojala J, Alafuzoff I, Herukka SK, van Groen T, Tanila H, Pirttilä T. (2009). Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 30 (2) : 198-209.

Okello A, Edison P, Archer HA, Turkheimer FE, Kennedy J, Bullock R, Walker Z, Kennedy A, Fox N, Rossor M, Brooks DJ. (2009). Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment: a PET study. *Neurology.* 72 (1) : 56-62.

Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 59 (2) : 278-92.

Onishi T, Iwashita H, Uno Y, Kunitomo J, Saitoh M, Kimura E, Fujita H, Uchiyama N, Kori M, Takizawa M. (2011). A novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor 2-methyl-5-(3-{4-[(S)-methylsulfinyl]phenyl}-1-benzofuran-5-yl)-1,3,4-oxadiazole decreases tau phosphorylation and ameliorates cognitive deficits in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*

119 (6) : 1330-40.

Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. (2004). Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1690 (3) : 193-202.

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009) Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nat Neurosci* 12 : 872–878.

## P

Pak MA, Haas HL, Decking UK, Schrader J. (1994). Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 33 : 1049–1053

Palmer JL, Abeles RH. (1979). The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 254 : 1217–1226

Pan XD, Zhu YG, Lin N, Zhang J, Ye QY, Huang HP, Chen XC. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar  $\beta$ -amyloid is attenuated by oligomeric  $\beta$ -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 6 : 45.

Pandolfo P, Machado NJ, Köfalvi A, Takahashi RN, Cunha RA. (2013). Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 23 (4): 317-28.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 333 (6048) : 1456-8.

Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. (2012). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (4) 197-205.

Pasinetti GM (2012). Novel role of red wine-derived polyphenols in the prevention of Alzheimer's disease dementia and brain pathology: experimental approaches and clinical implications. *Planta Med*. 78 (15) : 1614-9.

Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Pandolfo P, Duarte FS, Medeiros R, Calixto JB. (2009). Role of the macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ /CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide. *Am J Pathol*. 175 (4) : 1586-97.

Patel NS, Paris D, Mathura V, Quadros AN, Crawford FC, Mullan MJ. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2 (1) : 9.

Peeling P, Dawson B. (2007). Influence of caffeine ingestion on perceived mood states, concentration, and arousal levels during a 75-min university lecture. *Adv Physiol Educ*. 31 (4) : 332-5.

Pellicanò M, Larbi A, Goldeck D, Colonna-Romano G, Buffa S, Bulati M, Rubino G, Iemolo F, Candore G, Caruso C, Derhovanessian E, Pawelec G. (2012). Immune profiling of Alzheimer patients. *J Neuroimmunol*. 242 (1-2) : 52-9.

Perez DM, Karnik SS. (2005). Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors.

Pharmacol Rev. 57 (2) : 147-61. Review.

Pérez-González R, Antequera D, Vargas T, Spuch C, Bolós M, Carro E. (2011). Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 24 Suppl 2 : 17-25.

Petanceska SS, DeRosa S, Sharma A, Diaz N, Duff K, Tint SG, Refolo LM, Pappolla M. (2003). *J Mol Neurosci.* 20 (3) : 395-406. Changes in apolipoprotein E expression in response to dietary and pharmacological modulation of cholesterol.

Petrovitch H, White LR, Izmirilian G, Ross GW, Havlik RJ, Markesbery W, Nelson J, Davis DG, Hardman J, Foley DJ, Launer LJ. (2000). Midlife blood pressure and neuritic plaques, neurofibrillary tangles, and brain weight at death: the HAAS. Honolulu-Asia aging Study. *Neurobiol Aging.* 21 (1) : 57-62.

Phillis JW, O'Regan MH, Walter GA. (1989). Effects of two nucleoside transport inhibitors, dipyridamole and solufazine, on purine release from the rat cerebral cortex. *Brain Res* 481:309–316

Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ. (2005). Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol.* 90 (5) : 663-70.

Pisson G. (2009). Le vieillissement démographique sera plus rapide au Sud qu'au Nord. *Population & Société* 457 1-3

Pocock JM, Kettenmann H.(2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30 (10) : 527-35.

Polydoro M, Acker CM, Duff K, Castillo PE, Davies P. (2009). Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci.* 29 (34) : 10741-9.

Pohanka M. Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: a Link to Etiology? (2013). A Review. *Curr Med Chem* (in press).

Prasanthi JR, Dasari B, Marwarha G, Larson T, Chen X, Geiger JD, Ghribi O. (2010). Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radic Biol Med* 49 : 1212–1220

Prediger RD, Batista LC, Takahashi RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. (2005a). *Neurobiol Aging.* 26 (6) : 957-64.

Prediger RD, Fernandes D, Takahashi RN. (2005b). Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.* 159 (2) : 197-205.

Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV. (2010). Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry.* 67 (6) : 505-12.

Proudfoot AE. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2 (2) : 106-15. Review.

## Q

Qiu WW, Lai A, Mon T, Mwamburi M, Taylor W, Rosenzweig J, Kowall N, Stern R, Zhu H, Steffens DC. (2013). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Alzheimer Disease in the Presence of the Apolipoprotein E4 Allele. *Am J Geriatr Psychiatry* (in press).

Qosa H, Abuznait AH, Hill RA, Kaddoumi A. (2012). Enhanced brain amyloid- $\beta$  clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 31 (1) : 151-65.

## R

Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. (2010). Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20 (3) : 777-83.

Raffaitin C, Gin H, Empana JP, Helmer C, Berr C, Tzourio C, Portet F, Dartigues JF, Alperovitch A, Barberger-Gateau P. (2009). Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care.* 32 (1) : 169-74.

Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. (1996). Alzheimer's disease in Finnish twins. *Lancet.* 347 (9001) : 573-8

Räihä I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. (1997). Alzheimer's disease in twins. *Biomed Pharmacother.* 51 (3) : 101-4. Review.

Ramírez G, Toro R, Döbeli H, von Bernhardi R. (2005). Protection of rat primary hippocampal cultures from A beta cytotoxicity by pro inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiol Dis.* 19 (1-2) : 243-54.

Ransohoff RM. (2007). Microgliosis: the questions shape the answers. *Nat Neurosci.* 10 (12) : 1507-9.

Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, Kovac AD, Gerard C, Boddeke HW, Nitsch R, Kettenmann H. (2004). CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci.* 24 (39) : 8500-9.

Razay G, Vreugdenhil A, Wilcock G. (2007). The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 64 (1) : 93-6.

Rebola N, Oliveira CR, Cunha RA. (2002). Transducing system operated by adenosine A2A receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 454 (1) : 31-8.

Rebola N, Sebastiao AM, de Mendonca A, Oliveira CR, Ribeiro JA, Cunha RA. (2003). Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J Neurophysiol* 90 : 1295–1303

Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. (2008). Adenosine A2A receptors are essential for long-term 856 potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 57 : 121–134

Rebola N, Simões AP, Canas PM, Tomé AR, Andrade GM, Barry CE, Agostinho PM, Lynch MA, Cunha RA. (2011). Adenosine A2A receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J Neurochem.* 117 (1) : 100-11.

Reddington M, Pusch R. (1983). Adenosine metabolism in a rat hippocampal slice preparation: incorporation into S-adenosylhomocysteine. *J Neurochem.* 40 (1) : 285-90.

Rees K, Allen D, Lader M. (1999). The influences of age and caffeine on psychomotor and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl).* 145 (2) : 181-8.

Reinecke JB, DeVos SL, McGrath JP, Shepard AM, Goncharoff DK, Tait DN, Fleming SR, Vincent MP, Steinhilb ML. 2011. Implicating calpain in tau-mediated toxicity in vivo. *PLoS*

One. 6 (8)

Relling MV, Lin JS, Ayers GD, Evans WE. (1992). Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin Pharmacol Ther.* 52 (6) : 643-58.

Rétey JV, Adam M, Khatami R, Luhmann UF, Jung HH, Berger W, Landolt HP. (2007). A genetic variation in the adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clin Pharmacol Ther.* 81 (5) : 692-8.

Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C gamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem.* 283 (26) : 18177-86.

Rezai-Zadeh K, Gate D, Town T. (2009). CNS infiltration of peripheral immune cells : D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol* 4 (4) : 462-75.

Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. (2002). *Prog Neurobiol.* 68 (6) : 377-92. Review.

Riedel W, Hogervorst E, Lebox R, Verhey F, van Praag H, Jolles J. (1995). Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 122 (2) : 158-68.

Riedel A, Pignitter M, Hochkogler CM, Rohm B, Walker J, Bytof G, Lantz I, Somoza V. (2012). Caffeine dose-dependently induces thermogenesis but restores ATP in HepG2 cells in culture. *Food Funct.* 3 (9) : 955-64.

Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW. (2004). Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest.* 114 (1) : 121-30.

Ritchie K, Carriere I, de Mendonca A, Portet F, Dartigues JF, Rouaud O, Barberger-Gateau P, Ancelin ML. (2007). The neuroprotective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology* (69) : 536-45

Rivest S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 9 (6) : 429-39.

Robertson LA, Moya KL, Breen KC. (2004). The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 6 (5) : 489-95.

Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L. (2011). Amyloid- $\beta$ /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 31 (2) : 700-11.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376 (6543) : 775-8.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A et al. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.* 39 (2) : 168-77.

Rogers J, Lubner-Narod J, Styren SD, Civin WH. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 9 (4) : 339-49.

Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, Gemma C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 31 (45) : 16241-50.

Rönnemaa E, Zethelius B, Vessby B, Lannfelt L, Byberg L, Kilander L. (2012). Serum fatty-acid composition and the risk of Alzheimer's disease: a longitudinal population-based study. *Eur J Clin Nutr*. 66 (8) : 885-90.

Rostène W, Dansereau MA, Godefroy D, Van Steenwinckel J, Reaux-Le Goazigo A, Mélik-Parsadaniantz S, Apartis E, Hunot S, Beaudet N, Sarret P. (2011). Neurochemokines : a ménage à trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. *J Neurochem*. 118 (5) : 680-94.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 38 (1) : 24-6.

Rovio S, Kåreholt I, Helkala EL, Viitanen M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M. (2005). Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 4 (11) : 705-11.

## S

Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, Mulnard R, Barakos J, Gregg KM, Liu E, Lieberburg I, Schenk D, Black R, Grundman M, Bapineuzumab 201 Clinical Trial Investigators. (2009). A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 73 (24) : 2061-70.

Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Saman S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC, Hall GF. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 287 (6) : 3842-9.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 309 (5733) : 476-81.

Saunders AM, Schmeider K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N, (1993). Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet*. 342 (8873) : 710-1.

Saura J, Angulo E, Ejarque A, Casado V, Tusell JM, Moratalla R, Chen JF, Schwarzschild MA, Lluís C, Franco R et al. (2005). Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem* 95 : 919-929.

Sauvinet V, Parrot S, Benturquia N, Bravo-Moratón E, Renaud B, Denoroy L. (2003). In vivo simultaneous monitoring of gamma-aminobutyric acid, glutamate, and L-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection:



Analytical developments and in vitro/in vivo validations. *Electrophoresis*. 24 (18) : 3187-96.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 21 (1) : 172-88.

Scales TM, Derkinderen P, Leung KY, Byers HL, Ward MA, Price C, Bird IN, Perera T, Kellie S, Williamson R, Anderton BH, Reynolds CH. (2011). Tyrosine phosphorylation of tau by the SRC family kinases lck and fyn. *Mol Neurodegener*. 6 : 12.

Scarmeas N, Albert SM, Manly JJ, Stern Y. (2006). Education and rates of cognitive decline in incident Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 77 (3) : 308-16.

Schafer DP, Stevens B. (2010). Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem Soc Trans*. 38 (2) : 476-81.

Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 74 (4) : 691-705.

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP, Hamdane M, Buee L. (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 169, 599-616.

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (20) : 9649-53.

Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*. 38 (12) : 3549-58.

Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*. 23 (18) : 7084-92.

Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galdiks N, Küstermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Brüning JC. (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (9) : 3100-5.

Searcy JL, Phelps JT, Pancani T, Kadish I, Popovic J, Anderson KL, Beckett TL, Murphy MP, Chen KC, Blalock EM, Landfield PW, Porter NM, Thibault O. (2012). Long-term pioglitazone treatment improves learning and attenuates pathological markers in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 30 (4) : 943-61.

Sellebjerg F, Sørensen TL. (2003). Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull* 61 (3) : 347-55. Review.

Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buee L. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics*. 5, (2) :207-24.

Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT. (2013). Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 72 (6) : 462-71.

- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 303 (18) : 1832-40.
- Shah NS, Vidal JS, Masaki K, Petrovitch H, Ross GW, Tilley C, DeMattos RB, Tracy RP, White LR, Launer LJ. (2012). Midlife blood pressure, plasma  $\beta$ -amyloid, and the risk for Alzheimer disease: the Honolulu Asia Aging Study. *Hypertension*. 59 (4) : 780-6.
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. (1994). S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res*. 39 (4) : 398-404.
- Sheng JG, Zhu SG, Jones RA, Griffin WS, Mrak RE. (2000) Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo. *Exp Neurol*. 163 (2) : 388-91.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Perkicak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375 (6534) : 754-60.
- Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, Hosoya K, Terasaki T. (2004). Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. *J Neurosci*. 24 (43) : 9632-7.
- Silva CG, Métin C, Fazeli W, Machado NJ, Darmopil S, Launay PS, Ghestem A, Nesa MP, Bassot E, Szabó E, Baqi Y, Müller CE, Tomé AR, Ivanov A, Isbrandt D, Zilberter Y, Cunha RA, Esclapez M, Bernard C. (2013). Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Sci Transl Med*. 5 (197) : 197ra104.
- Simões AP, Duarte JA, Agasse F, Canas PM, Tomé AR, Agostinho P, Cunha RA. (2012). Blockade of adenosine A2A receptors prevents interleukin-1 $\beta$ -induced exacerbation of neuronal toxicity through a p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neuroinflammation*. 9 : 204.
- Simón D, García-García E, Gómez-Ramos A, Falcón-Pérez JM, Díaz-Hernández M, Hernández F, Avila J. (2012). Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener Dis*. 10 (1-4) : 73-5.
- Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB. (2010). MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging*. 31 (4) : 578-90.
- Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA : a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci*. 119 (10) : 2025-34.
- Smellie FW, Davis CW, Daly JW, Wells JN. (1979). Alkylxanthines: inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sci*. 24 (26) : 2475-82.
- Smillie LD, Gökçen E. (2010). Caffeine enhances working memory for extraverts. *Biol Psychol*. 85 (3) : 496-8.
- Smillie LD, Cooper AJ, Pickering AD. (2011). Individual differences in reward-prediction-

error: extraversion and feedback-related negativity. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 6 (5) : 646-52.

Smet-Nocca C, Broncel M, Wieruszeski JM, Tokarski C, Hanouille X, Leroy A, Landrieu I, Rolando C, Lippens G, Hackenberger CP. (2011). Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol Biosyst.* 7 (5) : 1420-9.

Smith AP, Rusted JM, Savory M, Eaton-Williams P, Hall SR. (1991). The effects of caffeine, impulsivity and time of day on performance, mood and cardiovascular function. *J Psychopharmacol.* 5 (2) : 120-8.

Smith AP, Christopher G, Sutherland D. (2013a). Acute effects of caffeine on attention: a comparison of non-consumers and withdrawn consumers. *J Psychopharmacol* 27 (1) : 77-83.

Smith AP. (2013b). Caffeine, extraversion and working memory. *J Psychopharmacol.* 27 (1) : 71-6.

Sofroniew MV, Vinters HV. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119 (1) : 7-35.

Solfrizzi V, Panza F, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Torres F, Grigoletto F, Maggi S, Del Parigi A, Reiman EM, Caselli RJ, Scafato E, Farchi G, Capurso A; Italian Longitudinal Study on Aging Working Group. (2004). Vascular risk factors, incidence of MCI, and rates of progression to dementia. *Neurology.* 63 (10) : 1882-91.

Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Del Parigi A, Capurso SA, Argentieri G, Capurso A, Panza F. (2006). Dietary fatty acids intakes and rate of mild cognitive impairment. *The Italian Longitudinal Study on Aging. Exp Gerontol.* 41 (6) : 619-27.

Song M, Jin J, Lim JE, Kou J, Pattanayak A, Rehman JA, Kim HD, Tahara K, Lalonde R, Fukuchi K. (2011). TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A $\beta$  deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 8 : 92.

Soto ME, van Kan GA, Nourhashemi F, Gillette-Guyonnet S, Cesari M, Cantet C, Rolland Y, Vellas B. (2013). Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Alzheimer's disease progression in older adults: results from the Réseau sur la Maladie d'Alzheimer Français cohort. *J Am Geriatr Soc.* 61 (9) : 1482-8.

Sparkman NL, Kohman RA, Scott VJ, Boehm GW. (2005). Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. *Physiol Behav.* 86 (1-2) : 244-51.

Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT. (2006). Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol.* 168 (5) : 1598-607.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F. (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol.* 155 (6) : 2153-65.

Stellwagen D, Malenka RC. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$  *Nature.* 440 (7087) : 1054-9.

Stern Y. (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia.* 47 (10) : 2015-28.

Stern Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 11 (11) : 1006-12.

Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 131 (6) : 1164-78.

Stöhr O, Schilbach K, Moll L, Hettich MM, Freude S, Wunderlich FT, Ernst M, Zemva J, Brüning JC, Krone W, Udelhoven M, Schubert M. (2013). Insulin receptor signaling mediates APP processing and  $\beta$ -amyloid accumulation without altering survival in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Age (Dordr)*. 35 (1) : 83-101.

Stoppelkamp S, Bell HS, Palacios-Filardo J, Shewan DA, Riedel G, Platt B. (2011). In vitro modeling of Alzheimer's disease: degeneration and cell death induced by viral delivery of amyloid and tau. *Exp Neurol* 229 : 226–237

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (5) : 1977-81.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. (1994). Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (23) : 11183-6.

Su JH, Zhao M, Anderson AJ, Srinivasan A, Cotman CW. (2001). Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res*. 898 (2) : 350-7.

Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem*. 286 (6) : 4566-75.

Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, Laferla FM. (2011). Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol*. 178 (6) : 2811-22.

## T

Tahara K, Kim HD, Jin JJ, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K. (2006). Role of toll-like receptor signalling in A $\beta$  uptake and clearance. *Brain*. 129 (11) : 3006-19

Takasaki J, Ono K, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. (2011). Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- $\beta$  in vitro. *J Alzheimers Dis*. 27 (2) : 271-80.

Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, Dziewczapolski G, Nakamura T, Cao G, Pratt AE, Kang YJ, Tu S, Molokanova E, McKercher SR, Hires SA, Sason H, Stouffer DG, Buczynski MW, Solomon JP, Michael S, Powers ET, Kelly JW, Roberts A, Tong G, Fang-Newmeyer T, Parker J, Holland EA, Zhang D, Nakanishi N, Chen HS, Wolosker H, Wang Y, Parsons LH, Ambasadhan R, Masliah E, Heinemann SF, Piña-Crespo JC, Lipton SA. (2013). A $\beta$  induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (27) : 2518-27.

Tanaka H, Nakazawa K, Arima M, Iwasaki S. (1984). Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain Dev*. 6 (4) : 355-61.

Tanaka T, Zhong J, Iqbal K, Trenkner E, Grundke-Iqbal I. (1998). The regulation of

phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett.* 426 (2) : 248-54.

Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science.* 235 (4791) : 880-4.

Tanzi RE. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 (10).

Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, Kumar P.(2002). Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 23 (2) : 237-43.

Tashiro K, Hasegawa M, Ihara Y, Iwatsubo T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport.* 8 (12) : 2797-801.

Tesseur I, Zou K, Esposito L, Bard F, Berber E, Can JV, Lin AH, Crews L, Tremblay P, Mathews P, Mucke L, Masliah E, Wyss-Coray T. (2006). Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest.* 116 (11) : 3060-9.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. (2002). Phases of A-beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 58 (12) : 1791-800

Thams S, Oliveira A, Cullheim S. (2008). MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res Rev.* 57 (1) : 265-9.

Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol.* 124 (1-2) : 83-92.

Toly-Ndour C, Lui G, Nunes MM, Bruley-Rosset M, Aucouturier P, Dorothée G. (2011). MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4+ T cell responses to amyloid- $\beta$  peptide in mice through regulatory T cell mediated inhibition. *J Immunol.* 187 (9) : 4492-500.

Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H. (2008). A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol.* 63 (3) : 377-87.

Tong L, Prieto GA, Kramár EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW. (2012). Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 $\beta$  via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci.* 32 (49) : 17714-24.

Torrent L, Ferrer I. (2012). PP2A and Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res.* 9 (2) : 248-56.

Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, Duman RS, Flavell RA. (2008). Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med.* 14 (6) : 681-7.

Townsend KP, Town T, Mori T, Lue LF, Shytle D, Sanberg PR, Morgan D, Fernandez F, Flavell RA, Tan J. (2005). CD40 signaling regulates innate and adaptive activation of microglia in response to amyloid beta-peptide. *Eur J Immunol* 35 (3) : 901-10.

Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci.* 31 (45) : 16064-9.

Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean ME, Zommer N, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Blum D, Buee L. (2012). Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY-Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res.* 9 (4) : 397-405.

Turrigiano GG. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell.* 135 (3) : 422-35.

## U

Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. (2006). CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cell Immunol.* 243 (1) : 19-29.

Usardi A, Pooler AM, Seereeram A, Reynolds CH, Derkinderen P, Anderton B, Hanger DP, Noble W, Williamson R. (2011). Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *FEBS J.* 278 (16) 2927-37.

## V

Van der Jeugd A, Ahmed T, Burnouf S, Belarbi K, Hamdane M, Grosjean ME, Humez S, Balschun D, Blum D, Buée L, D'Hooge R. (2011). Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem* 95 (3) : 296-304.

Van der Jeugd A, Vermaercke B, Derisbourg M, Lo AC, Hamdane M, Blum D, Buée L, D'Hooge R. (2013a). Progressive age-related cognitive decline in tau mice. *J Alzheimers Dis.* 37 (4) : 777-88.

Van der Jeugd A, Blum D, Raison S, Eddarkaoui S, Buée L, D'Hooge R. (2013b). Observations in THY-Tau22 mice that resemble behavioral and psychological signs and symptoms of dementia. *Behav Brain Res.* 242 : 34-9.

Van Eldik LJ, Griffin WS. (1994). S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* 1223 (3) : 398-403.

Van Gelder BM, Buijsse B, Tijhuis M, Kalmijn S, Giampaoli S, Nissinen A, Kromhout D. (2007). Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *European journal of clinical nutrition* (61) : 226-32.

Van Kooyk Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans.* 36 (6) : 1478-81.

Van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol.* 9 (9) : 2095-102. Review.

Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Hamilton RL, Mathis CA, Klunk WE, Apte UM, Wiley CA. (2009). PK11195 labels activated microglia in Alzheimer's disease and in vivo in a mouse model using PET. *Neurobiol Aging.* 30 (8) : 1217-26.

Venters HD, Tang Q, Liu Q, VanHoy RW, Dantzer R, Kelley KW. (1999). A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (17) : 9879-84.

## W

- Wacker J, Chavanon ML, Stemmler G. (2006). Investigating the dopaminergic basis of extraversion in humans: A multilevel approach. *J Pers Soc Psychol* 91 (1) : 171-87.
- Walker DG, Dalsing-Hernandez JE, Campbell NA, Lue LF. (2009). Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Exp Neurol*. 215 (1) : 5-19.
- Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schuffer W, Fassbender K. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*. 20 (6) : 947-56.
- Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI. (1993). A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Bio*. 121 (2) : 257-67.
- Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem*. 270 (9) : 4854-60.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1996). Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Brain Res Mol Brain Res*. 38 (2) : 200-8.
- Wang JH, Ma YY, van den Buuse M. (2006). Improved spatial recognition memory in mice lacking adenosine A2A receptors. *Exp Neurol* 199 : 438-445.
- Wang YJ, Zhou HD, Zhou XF. (2010a). Modified immunotherapies against Alzheimer's disease: toward safer and effective amyloid clearance. *J Alzheimers Dis*. 21 (4) : 1065-75.
- Wang DB, Dayton RD, Zweig RM, Klein RL. (2010b). Transcriptome analysis of a tau overexpression model in rats implicates an early pro-inflammatory response. *Exp Neurol*. 224 (1) : 197-206.
- Wang L, Jiang Q, Chu J, Lin L, Li XG, Chai GS, Wang Q, Wang JZ, Tian Q. (2013). Expression of tau40 induces activation of cultured rat microglial cells. *PLoS One*. 8 (10) : e76057.
- Ward SM, Himmelstein DS, Lancia JK, Binder LI. (2012). Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans*. 40 (4) : 667-71.
- Warren MW, Hynan LS, Weiner MF. (2012). Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 29 (1) : 151-7.
- Wegmann S, Medalsy ID, Mandelkow E, Müller DJ. (2013). The fuzzy coat of pathological human Tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (4) : 313-21.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72 (5) : 1858-62.
- Westerterp-Plantenga MS. (2010). Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. *Physiol Behav*. 100 (1) : 42-6.
- Wharton SB, O'Callaghan JP, Savva GM, Nicoll JA, Matthews F, Simpson JE, Forster G, Shaw PJ, Brayne C, Ince PG; (2009). MRC Cognitive Function and Ageing Neuropathology Study Group. Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 27 (5) : 465-73.

Whitmer RA, Gustafson DR, Barrett-Connor E, Haan MN, Gunderson EP, Yaffe K. (2008). Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology*. 71 (14) : 1057-64.

Williams JL, Kithcart AP, Smith KM, Shawler T, Cox GM, Whitacre CC. (2011). Memory cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) govern the transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 234 (1-2) : 84-92.

Williamson LL, Bilbo SD. (2013). Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. *Brain Behav Immun*. 30 : 186-94.

Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. (2010). Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 120 (5) : 1368-79.

Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenbiel M, Orgogozo JM, Graf A. (2012). Safety, tolerability, and antibody response of active A $\beta$  immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol*. 11 (7) : 597-604.

Wu CW, Liao PC, Lin C, Kuo CJ, Chen ST, Chen HI, Kuo YM. (2003). Brain region-dependent increases in beta-amyloid and apolipoprotein E levels in hypercholesterolemic rabbits. *J Neural Transm*. 110 (6) : 641-9.

Wyss-Coray T, Mucke L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease –a double-edged sword. *Neuron*. 35 (3) : 419-32. Review.

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. 9 (4) : 453-7.

## X

Xu XH, Zheng XX, Zhou Q, Li H. (2007). Inhibition of excitatory amino acid efflux contributes to protective effects of puerarin against cerebral ischemia in rats. *Biomed Environ Sci*. 20 (4) : 336-42.

## Y

Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. (1998) Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol*. 95 (3) : 217-22.

Yamamoto M, Horiba M, Buescher JL, Huang D, Gendelman HE, Ransohoff RM, Ikezu T. (2005). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am J Pathol*. 166 (5) : 1475-85.

Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T. (2007). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol*. 170 (2) : 680-92.

Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. (2012). PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -induced and CD36-mediated microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Neurosci*. 32 (48) : 17321-31.



- Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee JM. (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem.* 281 (34) : 24566-74.
- Yang YM, Shang DS, Zhao WD, Fang WG, Chen YH. (2013). Microglial TNF- $\alpha$ -Dependent elevation of MHC Class I expression on Brain Endothelium Induced by Amyloid-Beta Promotes T Cell Transendothelial Migration. *Neurochem Res.* 38 (11) : 2295-304.
- Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC. (2013). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.* 125 (6) : 897-908.
- Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC. (2013). IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production : a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.* 125 (6) : 897-908.
- Yegutkin GG. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* 1783 (5) : 673-94.
- Yirmiya R, Winocur G, Goshen I. (2002). Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem.* 78 (2) : 379-89.
- Yokokura M, Mori N, Yagi S, Yoshikawa E, Kikuchi M, Yoshihara Y, Wakuda T, Sugihara G, Takebayashi K, Suda S, Iwata Y, Ueki T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y. (2011). In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 38 (2) : 343-51.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron.* 53 (3) : 337-51.
- Younkin SG. (1998). The role of A $\beta$  42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris.* 92 (3-4) : 289-92. Review.
- Yu G, Maskray V, Jackson SH, Swift CG, Tiplady B. (1991). A comparison of the central nervous system effects of caffeine and theophylline in elderly subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 32 (3) : 341-5.
- Yu L, Huang Z, Mariani J, Wang Y, Moskowitz M, Chen JF. (2004). Selective inactivation or reconstitution of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in bone marrow cells reveals their significant contribution to the development of ischemic brain injury. *Nat Med.* 10 (10) : 1081-7.
- Yu CH, Si T, Wu WH, Hu J, Du JT, Zhao YF, Li YM. (2008) O-GlcNAcylation modulates the self-aggregation ability of the fourth microtubule-binding repeat of tau. *Biochem Biophys Res Commun.* 375 (1) : 59-62.
- Yu L, Shen HY, Coelho JE, Araújo IM, Huang QY, Day YJ, Rebola N, Canas PM, Rapp EK, Ferrara J, Taylor D, Müller CE, Linden J, Cunha RA, Chen JF. (2008b). Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Ann Neurol.* 63 (3) : 338-46.
- Yuan Z, Agarwal-Mawal A, Paudel HK. (2004). 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the brain. *J Biol Chem.* 279 (25) : 26105-14
- Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG (2009). Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease.

## Z

Zahniser NR, Simosky JK, Mayfield RD, Negri CA, Hanania T, Larson GA, Kelly MA, Grandy DK, Rubinstein M, Low MJ, Fredholm BB. (2000). Functional uncoupling of adenosine A2A receptors and reduced response to caffeine in mice lacking dopamine D2 receptors. *J Neurosci.* 20 (16) : 5949-57.

Zhao WQ, Feng C, Alkon DL. (2003). Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol Dis.* 14 (3) : 458-69.

Zhang C, Browne A, Child D, Divito JR, Stevenson JA, Tanzi RE. (2010). Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 285 (12) : 8515-26.

Zhang D, Xiong W, Albeni BC, Parkinson FE. (2011). Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 in mouse neurons regulates adenosine levels in physiological and hypoxic-ischemic conditions. *J Neurochem* 118 : 4–11

Zhang X, Hernandez I, Rei D, Mair W, Laha JK, Cornwell ME, Cuny GD, Tsai LH, Steen JA, Kosik KS. (2013). Diaminotriazoles modify Tau phosphorylation and improve the tauopathy in mouse models. *J Biol Chem.* 288 (30) : 22042-56.

Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem.* 252 (3) : 542-52.

Zhou SJ, Zhu ME, Shu D, Du XP, Song XH, Wang XT, Zheng RY, Cai XH, Chen JF, He JC. (2009). Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A2A receptors. *Brain Res* 1303:74–83

Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. (2011) The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr.* 5 (4) : 280-92. Review.

Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseikova E, Novak M. (2006). Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580 (15) : 3582-8.

Zilka N, Stozicka Z, Kovac A, Pilipcinec E, Bugos O, Novak M. (2009). Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. *J Neuroimmunol.* 209 (1-2) : 16-25.

Zilkova M, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Skrabana R, Skrabanova M, Novak M. (2011). Hyperphosphorylated truncated protein tau induces caspase-3 independent apoptosis-like pathway in the Alzheimer's disease cellular model. *J Alzheimers Dis.* 23 (1) : 161-9.



