



**HAL**  
open science

# Nouveaux concepts pour une imagerie fonctionnelle des récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A et 5-HT6 lors de processus neurodégénératifs

Guillaume Becker

► **To cite this version:**

Guillaume Becker. Nouveaux concepts pour une imagerie fonctionnelle des récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A et 5-HT6 lors de processus neurodégénératifs. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10270 . tel-01158732

**HAL Id: tel-01158732**

**<https://theses.hal.science/tel-01158732v1>**

Submitted on 1 Jun 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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

Neurosciences et Cognition

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 11.12.2013

par

**BECKER Guillaume Luc Patrice**

**Nouveaux concepts pour une imagerie fonctionnelle des récepteurs  
sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>6</sub> lors de processus neurodégénératifs**

Directeur de thèse  
Pr. Luc Zimmer

JURY    Dr. Yves Charnay, Genève (rapporteur)  
          Pr. François Dauphin, Caen (rapporteur)  
          Dr. Adrian Newman-Tancredi, Castres-San Diego (examineur)  
          Pr. Pierre Krolak-Salmon, Lyon (examineur)  
          Dr. Thierry Billard, Lyon (co-directeur)



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

## Remerciements

L'ensemble de ce travail a été réalisé au CERMEP de Lyon, je tiens à remercier le Professeur Gérard Gimenez, de m'avoir accueilli dans le centre tout au long de mon internat.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

A M. le Pr Luc Zimmer

Travailler avec vous, tout au long de ces années, fut pour moi un honneur. J'ai découvert un métier passionnant grâce à vous, et vous m'avez encadré avec disponibilité et bienveillance. Soyez assuré de ma gratitude et de ma reconnaissance éternelle.

A M. le Dr Thierry Billard

J'ai beaucoup appris grâce à toi et à tes connaissances, en radiochimie mais pas seulement car celles-ci sont nombreuses et variées. L'ensemble de ce travail n'aurait pas été possible sans toi. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon respect.

A M. le Dr. Adrian Newman-Tancredi

Je te remercie pour les nombreuses et passionnantes discussions scientifiques que nous avons eu au cours de ces années. Ton expérience fut pour moi une aide précieuse. Sois assuré de ma reconnaissance et de mon respect.

A M. le Pr. François Dauphin et Mr le Dr. Yves Charnay

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de rapporter mon travail, et de venir de loin pour participer à la soutenance. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon respect.

A M. le Pr. Pierre Krolak-Salmon

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Vos conseils m'ont été très utiles dans la finalisation de mes travaux. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon respect

### *A mes collègues du CERMEP*

Je remercie toute l'équipe de radiochimistes Fred, François et Christian pour leur aide et leur bonne humeur, Ainsi que Didier Le Bars pour m'avoir formé à la radiopharmacie. Travailler avec vous au quotidien est un plaisir.

Je remercie l'équipe BIORAN : Sylvain, Luc, Armand, Sophie, Isabelle, Benoit, Mathieu, Fabien, Laure, Elise, pour nos réunions scientifiques stimulantes, malgré leurs horaires matinaux.

Je remercie Sylvain et Nathalie avec qui j'ai réalisé les travaux post-mortem, je n'aurais sans doute pas pu les faire sans vous.

Je remercie Radu, Jean-Baptiste et Véronique pour leur aide technique précieuse durant les manip. de pharmacoIRM. Et bien sûr Nicolas et Jérôme qui m'ont énormément aidé pour l'analyse SPM qui s'en est suivie.

Je remercie Franck, Fabienne, Audrey et Vero. pour votre aide lors des examens TEP chats. Caroline, tu m'as beaucoup aidé dans le traitement de données TEP et microTEP et je t'en remercie chaleureusement.

### *A ma famille*

A mes parents et mes deux frères, qui m'ont toujours soutenu et grâce à qui j'ai une vie si heureuse.

A Gaby, qui passe un moment difficile mais qui m'impressionne toujours par sa force de vie incroyable.

A ma deuxième famille, Anne, Michel et Lisa.

A Héloïse et Naélie.

A Philippe et Marie, Charline, Ludo, Ruben et Dahlia.

A la famille Becker, Martine et Jean-Claude, Michel et Laurence et mes cousins et cousines Alexandra, Pauline et Ambre. Et bien sûr Robin.

A ma grand-mère Simone et tout ceux qui ne sont plus parmi nous, vous me manquez.

### *A mes amis*

A Pyrolyse : Mike, Guillaume et Math. Et bien sûr Julien.

A Burdeau : Clair, Bishop, Antoine et Elie.

Au Jean Moulois : Ben, Antoine, Thierry, Remi Massdinde, Bito, Abusedinde, David, Emilio, Seb, Fremax, Soel, Remi Divon, Camille, Charlotte, Vico, Barnabé, Jess....

A Morgan

### *A ma belle Famille*

Marianne et Olivier, et mes frères d'adoption Nico et Jules. A ma chère belle-sœur Chloé.

Je suis enchanté d'avoir contribué à agrandir cette merveilleuse famille Malatre.

*Aux femmes de ma vie, Sophie et Sarah.*

## **Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :**

### **Articles dans des journaux scientifiques internationaux**

- Becker G, Streichenberger N, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L. A post-mortem study to compare agonist and antagonist 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in Alzheimer's disease: Toward a new concept in PET imaging? En révision
- Becker G, Colomb J, Billard T, Zimmer L. Preclinical evaluation of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor radioligands for PET imaging. En préparation
- Colomb J, Becker G, Zimmer L, Billard T. Synthesis, radiosynthesis and preliminary evaluation of potential PET <sup>18</sup>F-radioligands for the 5-HT<sub>6</sub> receptor. En préparation
- Becker G, Bolbos R, Costes N, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Specific patterns of 5-HT<sub>1A</sub> agonists detected by pharmacMRI. En préparation

### **Communications orales en congrès internationaux**

- Becker G, Colomb J, Billard T, Zimmer L. Radiosynthesis and radiopharmacological evaluation of fluorinated PET radioligands for the 5-HT<sub>6</sub> receptors. Society of Nuclear Medicine Congress, Vancouver, 2013
- Tavares A, Becker G, Barret O, Morley T, Alagille A, Vacher B, Newman-Tancredi A, Tamagnan G, Zimmer L. Initial evaluation of [<sup>18</sup>F]F13714, a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist in non-human primates. European Nuclear Medicine Congress, Lyon, 2013
- Becker G, Colomb J, Billard T, Zimmer L. Preclinical evaluation of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor radioligands for PET imaging. European Nuclear Medicine Congress, Lyon, 2013
- Becker G, Streichenberger N, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L. A post-mortem study to compare the 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding of a PET agonist and a PET antagonist in Alzheimer's disease. European Nuclear Medicine Congress, Lyon, 2013

### **Communications orales en congrès nationaux**

- Towards functional TEP imaging of 5HT<sub>1A</sub> receptors. Colloque de la Société du Cerveau et des maladies Cérébrovasculaires. Paris, 2013.

### **Communications écrites en congrès internationaux**

- Becker G, Colomb J, Le Bars D, Billard T, Zimmer L. Radiosynthesis and preclinical evaluation of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor radioligands for PET imaging. European Molecular Imaging Meeting, Turin, 2013.
- Colomb J, Becker G, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. Synthesis and evaluation of potential PET <sup>18</sup>F-radioligands for the 5-HT<sub>6</sub> receptor. International Society of Radiopharmaceutical Sciences, Korea, 2013

### **Communications écrites en congrès nationaux**

- Becker G, Bolbos R, Langlois J-B, Newmann-Tancredi A, Costes N, Zimmer L. Brain activation patterns of serotonin-1A agonists: a 7T pharmacological – MRI study in the rat. GDR – life imaging: News methodologies in life imaging. Lyon, 2012.
- Becker G, Colomb J, Billard T, Zimmer L. Comparison of radiolabelled antagonists for serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor PET neuroimaging. Colloque de la société des neurosciences. Lyon, 2013.



<b>I. Rappels bibliographiques .....</b>	<b>11</b>
<b>A. La maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>11</b>
1. Epidémiologie.....	11
2. Physiopathologie.....	14
a) Support neuro-anatomique.....	14
i. Les plaques séniles amyloïdes .....	14
ii. Les dégénérescences neurofibrillaires.....	17
iii. La perte neuronale.....	18
b) La progression des lésions.....	19
3. Manifestations cliniques.....	23
a) Symptomatologie .....	23
b) Le concept de « Mild Cognitive Impairment » (MCI) .....	28
c) Les différents stades de la MA.....	29
4. Diagnostic .....	32
a) Critères diagnostiques .....	32
i. Les critères diagnostiques majeurs .....	32
ii. Les tests neuropsychologiques.....	33
iii. La mise à jour des critères diagnostiques.....	35
b) Les biomarqueurs.....	37
i. Biomarqueurs physiopathologiques .....	37
ii. Biomarqueurs topographiques.....	42
c) Diagnostic différentiel .....	46
5. Traitements.....	47
a) Schéma thérapeutique actuel .....	47
b) La recherche thérapeutique.....	50
<b>B. La neurotransmission sérotoninergique dans la MA.....</b>	<b>52</b>
1. La neurotransmission sérotoninergique .....	52
a) La sérotonine .....	52
b) Anatomie du réseau sérotoninergique cérébral .....	54
i. Les corps cellulaires .....	54
ii. Les projections.....	55
c) Les récepteurs sérotoninergiques.....	57
2. Le système sérotoninergique dans la MA.....	60
<b>C. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>61</b>
1. Les récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> .....	61
2. Structure.....	62
3. Distribution.....	63
4. Propriétés fonctionnelles .....	65
5. Agents pharmacologiques et utilisations thérapeutiques .....	66
6. Implication des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> dans la maladie d'Alzheimer.....	67
<b>D. Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans la MA .....</b>	<b>69</b>
1. Les récepteurs 5-HT <sub>6</sub> .....	69
2. Structure.....	70
3. Distribution.....	72
4. Propriétés fonctionnelles.....	74
5. Agents pharmacologiques et utilisations thérapeutiques .....	75
6. Implication des récepteurs 5-HT <sub>6</sub> dans la maladie d'Alzheimer.....	76

<b>II. Imagerie fonctionnelle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub></b> .....	<b>79</b>
<b>A. Les radiotraceurs TEP agonistes et le couplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA</b> .....	<b>79</b>
<b>1. Rationnel</b> .....	<b>79</b>
<b>2. Objectif</b> .....	<b>82</b>
<b>3. Matériels et méthodes</b> .....	<b>83</b>
<b>a) Radiosynthèses</b> .....	<b>83</b>
i. Radiosynthèse du [ <sup>18</sup> F]MPPF.....	83
ii. Radiosynthèse du [ <sup>18</sup> F]F15599.....	84
<b>b) Recueil et préparation des échantillons de patients</b> .....	<b>85</b>
i. Prélèvement post mortem .....	86
ii. Sélection et préparation des échantillons.....	86
iii. Données recueillies.....	86
iv. Préparation des échantillons.....	86
<b>c) Autoradiographie quantitative in vitro</b> .....	<b>87</b>
i. Principe et instrumentation.....	87
ii. Réalisation .....	88
iii. Gamme étalon .....	89
iv. Couplage aux protéines G.....	90
<b>d) Analyses statistiques</b> .....	<b>90</b>
<b>4. Résultats</b> .....	<b>91</b>
<b>a) Données démographiques</b> .....	<b>91</b>
i. Effectif étudié.....	91
ii. Pathologies associées.....	92
<b>b) Autoradiographies quantitatives</b> .....	<b>92</b>
i. Identification des régions d'intérêts.....	92
ii. Autoradiographie quantitative in vitro .....	94
<b>(a) Fixation spécifique du [<sup>18</sup>F]F15599 sur les récepteurs couplés aux protéines G</b> .....	<b>94</b>
<b>(b) Fixation des radiotraceurs dans la région CA1</b> .....	<b>95</b>
<b>(c) Fixation des radiotraceurs dans le gyrus denté</b> .....	<b>98</b>
<b>5. Discussion</b> .....	<b>100</b>
<b>B. Pattern d'activation des agonistes 5-HT<sub>1A</sub></b> .....	<b>106</b>
<b>1. Rationnel</b> .....	<b>106</b>
<b>2. Objectif</b> .....	<b>111</b>
<b>3. Matériels et méthodes</b> .....	<b>112</b>
<b>a) Les animaux</b> .....	<b>112</b>
<b>b) Les procédures animales</b> .....	<b>112</b>
<b>c) Agents pharmacologiques</b> .....	<b>113</b>
i. 8-OH-DPAT .....	113
ii. F13714 .....	113
iii. F15599 .....	113
iv. MPPF.....	113
<b>d) Protocole IRM</b> .....	<b>114</b>
i. Acquisition des données .....	114
ii. Analyse statistique .....	115
<b>4. Résultats</b> .....	<b>117</b>
<b>a) Cartes d'activation</b> .....	<b>117</b>
i. 8-OH-DPAT .....	117

ii. F13174 .....	118
iii. F15599 .....	118
iv. MPPF.....	118
<b>b) Comparaison de la significativité des tests t.....</b>	<b>124</b>
<b>5. Discussion .....</b>	<b>127</b>
<b>III. Imagerie TEP des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> .....</b>	<b>136</b>
<b>A. Rationnel .....</b>	<b>136</b>
<b>B. Objectif.....</b>	<b>137</b>
<b>C. Matériels et méthodes.....</b>	<b>138</b>
<b>1. Sélection des ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub> .....</b>	<b>138</b>
a) Synthèse des antagonistes 5-HT <sub>6</sub> .....	138
b) Radiomarquage des ligands sélectionnés .....	138
c) Lipophilie et affinité <i>in vitro</i> .....	142
<b>2. Les animaux et les procédures animales .....</b>	<b>142</b>
a) Les animaux .....	142
i. Rats.....	142
ii. Chats.....	143
b) Les procédures animales.....	143
i. Anesthésie .....	143
ii. Cathétérisation.....	143
c) Les traitements pharmacologiques.....	144
i. SB-258585 : .....	144
ii. Ciclosporine : .....	144
d) Les techniques utilisées.....	144
i. Autoradiographies <i>in vitro</i> .....	144
ii. Imagerie TEP et microTEP.....	145
(a) Réalisation des examens $\mu$ TEP chez le rat.....	145
(b) Réalisation des examens TEP chez le chat.....	146
<b>D. Résultats.....</b>	<b>148</b>
<b>1. Pharmacologie <i>in vitro</i> et lipophilie.....</b>	<b>148</b>
<b>2. Autoradiographies <i>in vitro</i> .....</b>	<b>148</b>
<b>3. Pénétration cérébrale <i>in vivo</i> .....</b>	<b>150</b>
a) Imagerie TEP chez le chat.....	150
b) Imagerie $\mu$ TEP du [ <sup>18</sup> F]2FNQ1P chez le rat. ....	150
<b>4. Imagerie TEP <i>in vivo</i> chez le chat du radioligands [<sup>18</sup>F]2FNQ1P .....</b>	<b>152</b>
a) Cinétique de fixation du [ <sup>18</sup> F]2FNQ1P et compétition avec le ligand froid .....	152
b) Reproductibilité .....	154
<b>5. Profil pharmacologique du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P .....</b>	<b>154</b>
<b>E. Discussion .....</b>	<b>156</b>
<b>IV. Conclusion générale.....</b>	<b>163</b>
<b>V. Annexes.....</b>	<b>164</b>
<b>A. Annexe 1 .....</b>	<b>164</b>
<b>B. Annexe 2 .....</b>	<b>165</b>
<b>VI. Bibliographie.....</b>	<b>167</b>

# **I. Rappels bibliographiques**

## **A. La maladie d'Alzheimer**

### **1. Epidémiologie**

En 2006, selon les statistiques de l'INSEE, le nombre de personnes de plus de 60 ans s'élevait à 12,5 millions de personnes. A l'horizon 2050, les plus de 60 ans pourraient représenter 31,5 % de la population française avec 22,4 millions d'individus. Ce vieillissement de la population induit une augmentation progressive de la prévalence des démences du sujet âgé.

Parmi celles-ci, la maladie d'Alzheimer (MA) est la plus fréquente, on lui impute environ 70 % ces cas de démences. La MA touche aujourd'hui plus 25 millions de personnes dans le monde. En France, les données les plus précises sont fournies par l'étude prospective PAQUID (Personnes âgées QUID) qui suit de façon longitudinale 3777 participants initiaux depuis 1988 (Alperovitch, et al., 2002). Cette étude est la première réalisée en France sur un échantillon de la population générale et présente l'avantage d'éviter les biais de recrutement liés à l'absence de représentativité des malades examinés ou suivis dans les hôpitaux. Elle permet ainsi une estimation fiable de la prévalence des pathologies associées au grand âge.

Parmi les nombreux résultats issus de cette cohorte, il ressort que 17,8 % des personnes de 75 ans et plus sont atteints d'une MA ou d'une maladie apparentée (Helmer, et al., 2006a). De plus, cette prévalence augmente avec l'âge (tableau 1). Comme pour les données de prévalence, les estimations d'incidence sont très variables dans les données publiées, c'est pourquoi ces estimations sont réévaluées sur les années de suivi de PAQUID. En 2006, l'extrapolation des données sur la population française de 2004 révèle un nombre d'environ 225 000 nouveaux cas annuels de démences. De la même façon, le nombre de patients atteints de la MA ou d'une maladie apparentée est estimé, selon plusieurs études, à 850 000 cas chez les personnes de 65 ans et plus (Helmer, et al., 2006b ; Ramarosan, et al., 2003).

Un des avantages majeurs des études de suivi longitudinal est l'analyse, ou bien la mise en évidence, de facteurs de risque ainsi que d'éventuels facteurs protecteurs. Nous savons aujourd'hui que la MA est une maladie multifactorielle associant à la fois des facteurs de risques environnementaux et certains déterminismes génétiques.

Age	hommes	femmes	Total
75-79	7,7 %	5,7 %	6,5 %
80-84	12,5 %	16,6 %	15,1 %
85-99	22,9 %	29,9 %	27,6 %
90 et plus	27,0 %	52,8 %	47,0 %
Total	13,2 %	20,5 %	17,8 %

**Tableau 1** : Prévalence de la démence selon l'âge (d'après Helmer, et al., 2006b).

### **Les Facteurs de risques :**

L'âge est le premier facteur de risque de la MA (Braak et Braak, 1997). En effet, sous sa forme sporadique, qui représente plus de 90 % des cas, la MA se retrouve très majoritairement chez les plus de 65 ans. La présence d'antécédents familiaux de MA, en dehors des formes familiales résultantes de mutations de gènes précis, est un autre facteur de risque bien décrit (Jayadev, et al., 2008). En plus de ces deux facteurs majeurs, des études épidémiologiques soulignent la multitude d'autres facteurs de risques et, à l'inverse, de facteurs protecteurs.

Les personnes ayant souffert d'ischémie cérébrale (accidents vasculaires cérébraux, accidents ischémiques transitoires et d'autres troubles regroupés sous le terme de « stroke » en anglais) ont un risque accru de développer une MA. De plus, la présence de facteurs de risques cardio-vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, augmente encore ce risque pour cette population (Reitz, et al., 2007). S'il est reconnu qu'un faible niveau d'éducation est aussi un facteur de risque, les activités stimulantes, d'un point de vue intellectuel, et les loisirs protègent de la MA (pour revue Mayeux, 2003). L'activité physique régulière est reconnue comme étant un facteur protecteur majeur. La consommation modérée de vin et la consommation de café semblent être d'autres facteurs protecteurs (Lindsay, et al., 2002 ; Orgogozo, et al., 1997). Enfin les interactions familiales, et d'un point de vue plus général le réseau social, ont une importance non négligeable (Fratiglioni, et al., 2000).

En dehors des facteurs environnementaux, il existe aussi des facteurs génétiques très influents dans la MA, dans sa forme familiale aussi bien que sporadique.

Le premier, et celui qui possède la plus grande force d'association avec la MA, est la présence du variant allélique epsilon 4 (E4) du gène de l'apolipoprotéine E (apoE). Ce gène, situé sur le chromosome 19, existe sous 3 allèles différents : E2, E3 et E4. La

répartition des allèles dans la population générale n'est pas homogène, et la forme homozygote E3/E3 est majoritaire à 80 %. L'apoE est une protéine présente dans les vésicules lipidiques du sang ; impliquée dans le métabolisme des lipides, elle est un transporteur majeur du cholestérol. Des études ont montré que la présence de l'allèle E4 augmente d'un facteur deux le risque de MA à l'état hétérozygote, et d'un facteur cinq à l'état homozygote. En revanche, l'allèle E2 diminue le risque de développer la maladie (Corder, et al., 1993 ; pour revue Liu, et al., 2013).

Les formes génétiques de la MA sont souvent caractérisées par un début précoce de la maladie (parfois avant 30 ans) et une évolution plus rapide. Une forme familiale autosomique dominante a été identifiée et associée à des mutations génétiques précises. Ces dernières portent sur les gènes codant « l'amyloïde precursor protein » (APP), la préséniline-1 (PS-1) et préséniline-2 (PS-2). Les gènes, PS-1 sur le chromosome 14 et PS-2 sur le chromosome 1, codent les protéines  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases. Celles-ci sont impliquées dans le complexe de clivage de la protéine APP et conduisent à la formation des dépôts amyloïdes (Levy-Lahad, et al., 1995 ; Sherrington, et al., 1995). La première mutation identifiée et dont on a prouvé l'implication directe dans la MA porte sur le gène APP (Goate, et al., 1991). Celui-ci est situé sur le chromosome 21 et code le précurseur de la protéine amyloïde. De plus, les patients atteints du syndrome de Down, ou trisomie 21, développent vers 40 ans des lésions amyloïdes et neurofibrillaires identiques à celles retrouvées dans la MA. Concernant ces patients, ce phénomène est appelé « MA-like » (pour revue Webb et Murphy, 2012).

Pendant les années 90 et 2000, aucun autre déterminant génétique n'a été identifié. Mais au cours de la dernière décennie, les progrès méthodologiques et techniques, comme les études « genom-wide association study » qui permettent l'analyse, au sein de cohortes importantes, de très nombreux variants génétiques et leurs associations à certains phénotypes, ont fortement dynamisé la recherche de déterminants génétique de la MA. La première vague d'études de ce genre a montré des « single nucleotide polymorphisms » portant sur certains loci, notamment *CLU* (pour clusterine), *CR1* (système complément), *BIN1* et *PICALM*, associés aux phénotypes de la MA (pour revue Bettens, et al., 2013 ; Harold, et al., 2009). Pour ce qui est de la transmission mendélienne des formes autosomiques, les études en « whole-exome sequencing » ont révélé que des mutations de *SORL1* ont un très fort taux d'association avec les formes familiales précoces de MA (Pottier, et al., 2012). La recherche de déterminants

génétiqes de la MA continue aujourd'hui encore, et de nouveaux gènes impliqués seront probablement découverts dans les années qui viennent.

## 2. Physiopathologie

### *a) Support neuro-anatomique*

Sur un plan histo-pathologique, la MA se caractérise par deux types de lésions cérébrales, toutes deux constituées d'agrégats protéiques : les plaques séniles, formées d'agrégats extracellulaires toxiques de peptides amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou « neurofibrillary tangles » NFT en anglais), qui sont des agrégats intraneuronaux de protéine tau anormalement phosphorylée. A ces deux lésions histologiques s'ajoute un troisième phénomène qui caractérise la MA, une perte neuronale importante et progressive.

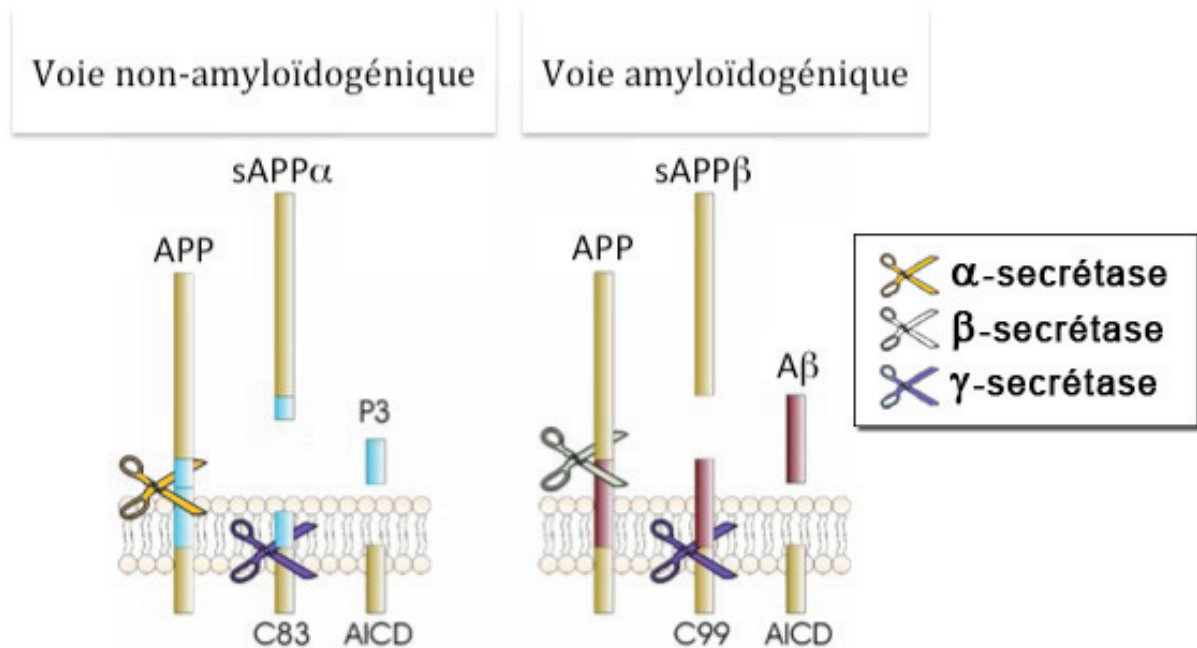
#### i. Les plaques séniles amyloïdes

Isolée pour la première fois à partir de vaisseaux méningés provenant de cas d'angiopathies amyloïdes, la protéine  $\beta$ -amyloïde ou peptide  $A\beta$  existe sous plusieurs formes selon le nombre d'acides aminés (aa). Une forme courte de 40 aa ( $A\beta_{40}$ ) a été décrite, ainsi que deux formes longues de 42 et 43 aa ( $A\beta_{42}$  et  $A\beta_{43}$ ). Ces différentes formes proviennent toutes du clivage, en différents sites, de la protéine précurseur APP beaucoup plus longue, comprenant de 698 à 770 aa selon les isoformes.

Il existe trois sites principaux de clivage de l'APP, qui impliquent chacun un système enzymatique particulier (Mattson et Furukawa, 1997). Chaque système est associé au terme sécrétase pour rendre compte du fait que la plupart des fragments de l'APP issus de ce clivage sont sécrétés. La  $\beta$ -sécrétase clive entre les résidus 671 et 672 (partie N-terminale d' $A\beta$ , domaine extracellulaire), l' $\alpha$ -sécrétase, entre les résidus 687 et 688 (résidus 16 et 17 d' $A\beta$ ) et la  $\gamma$ -sécrétase, après les résidus 710 à 714 (partie C-terminale d' $A\beta$ , intracellulaire). Deux principales voies de clivage distinctes de l'APP en résultent (Figure 1).

Le clivage en  $\alpha$  et  $\beta$  entraîne la libération de dérivés solubles de la protéine (sAPP $\alpha$  et sAPP $\beta$ ) et la rétention au niveau de la membrane de fragments C-terminaux de 83 ou 99 aa (C83 et C99). Le peptide C83 est ensuite clivé en position  $\gamma$  par le complexe  $\gamma$ -sécrétase, donnant naissance à un fragment court nommé p3 et à AICD (pour « APP

Intracellular Domain » en anglais). Quant au peptide C99, son clivage en  $\gamma$  conduit à la formation de AICD, et du peptide A $\beta$ , secrété dans l'espace extracellulaire et composant majeur des plaques amyloïdes, observées chez les patients atteints de MA (pour revue Annaert, et al., 2000 ; Steiner et Haass, 2000). En effet, ce peptide A $\beta$  insoluble va se déposer sous différentes formes dans le milieu extracellulaire.



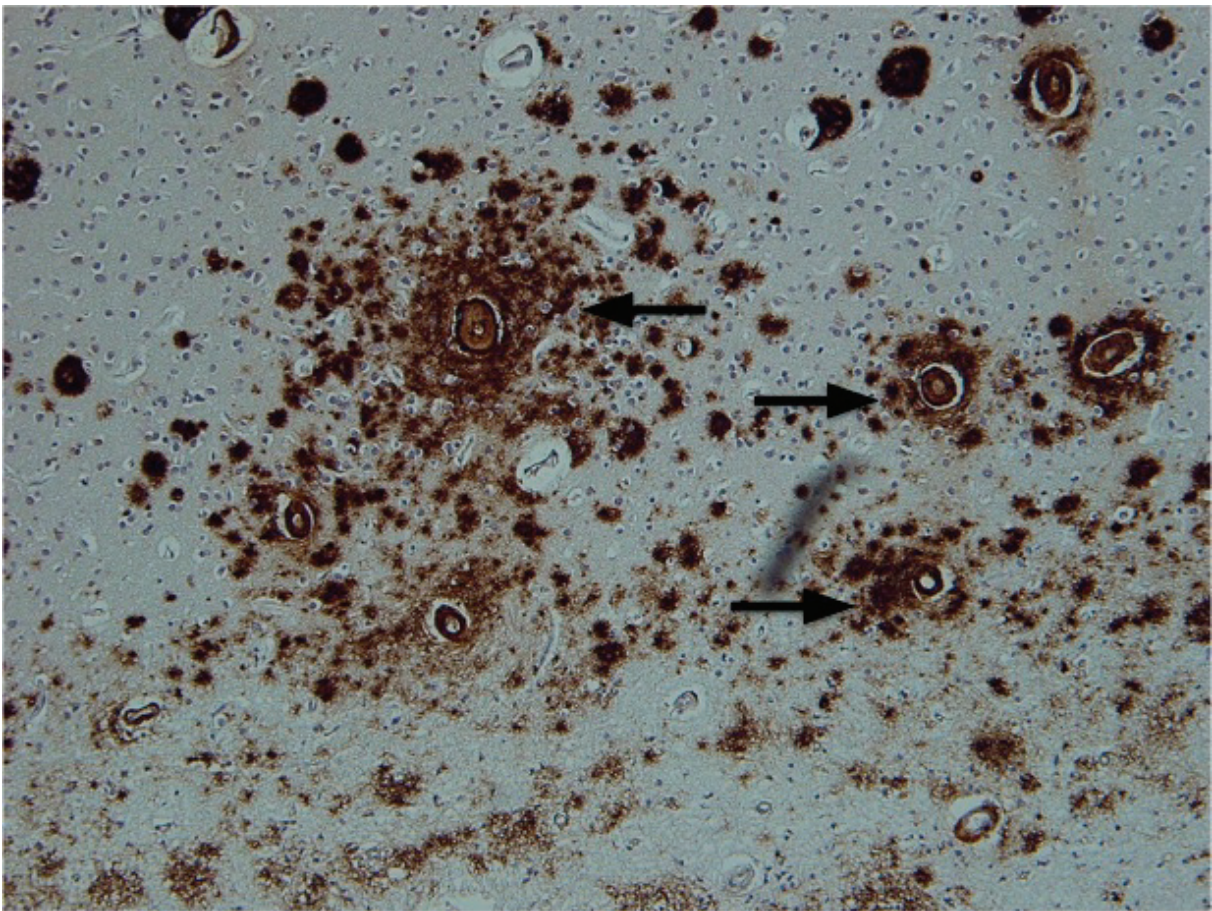
**Figure 1 :** Voies de clivage du précurseur de la protéine amyloïde (APP). (sAPP $\alpha$  : dérivé soluble  $\alpha$  du précurseur APP ; sAPP $\beta$  : dérivé soluble  $\beta$  du précurseur APP ; C83 : fragment C-terminal de 83 aa ; C99 : fragment C-terminal de 99 aa ; p3 : fragment court ; A $\beta$  : peptide A $\beta$  ; AICD : « APP intracellular domain ») (D'après le site internet [accs.ens-lyon.fr](http://accs.ens-lyon.fr)).

Les dépôts diffus sont volumineux (plusieurs centaines de micromètres), mal délimités et contiennent essentiellement la forme longue A $\beta$ 42 du peptide. Ces dépôts diffus ne semblent pas corrélés à l'état cognitif des individus et sont souvent retrouvés chez les personnes âgées non démentes. Ils représenteraient néanmoins des formes « préamyloïdes » qui donnent naissance aux plaques séniles (Iwatsubo, et al., 1994).

Les dépôts focaux sont petits et sphériques (une centaine de micromètres). Bien délimités, ils correspondent à un dépôt dense dont le cœur est majoritairement composé de peptides A $\beta$ 40 agrégés en feuillets plissés  $\beta$ . Ces dépôts sont toxiques pour les cellules environnantes et souvent accompagnés d'une gliose réactionnelle. Lorsque le cœur de ces dépôts est entouré d'une couronne de prolongement nerveux, cela forme une plaque sénile, lésion spécifique de la MA (Figure 2).



Le caractère pathologique des dépôts focaux provient de l'agrégation du peptide A $\beta$  devenu insoluble à la suite d'un changement conformationnel. Le peptide s'assemble alors en feuillets  $\beta$  qui forment des protofilaments. Cinq de ces sous-unités se réorganisent ensuite pour former une fibrille amyloïde dont la section est comprise entre 60 et 100 Å (Serpell, et al., 2000). Les dépôts amyloïdes grossissent avec le temps et se transforment en masses sphériques, appelées plaques amyloïdes, de 5 à 100  $\mu$ m de diamètre. Lorsque des prolongements nerveux viennent entourer ces plaques, elles prennent le nom de plaques séniles.



**Figure 2 :** Plaques amyloïdes (flèches noires) retrouvées dans un tissu cérébral humain. Marquage par immunohistochimie du peptide A $\beta$  (d'après le Dr. Nathalie Streichenberger, communication personnelle).

Initialement, seule l'accumulation extracellulaire des dépôts d'amyloïdes était considérée comme l'élément toxique provoquant la mort des neurones environnants. Mais, la neurotoxicité d'oligomères A $\beta$  a été démontré par des études *in vitro* (Lambert, et al., 1998). De plus, une équipe a montré chez la souris, la capacité d'oligomères

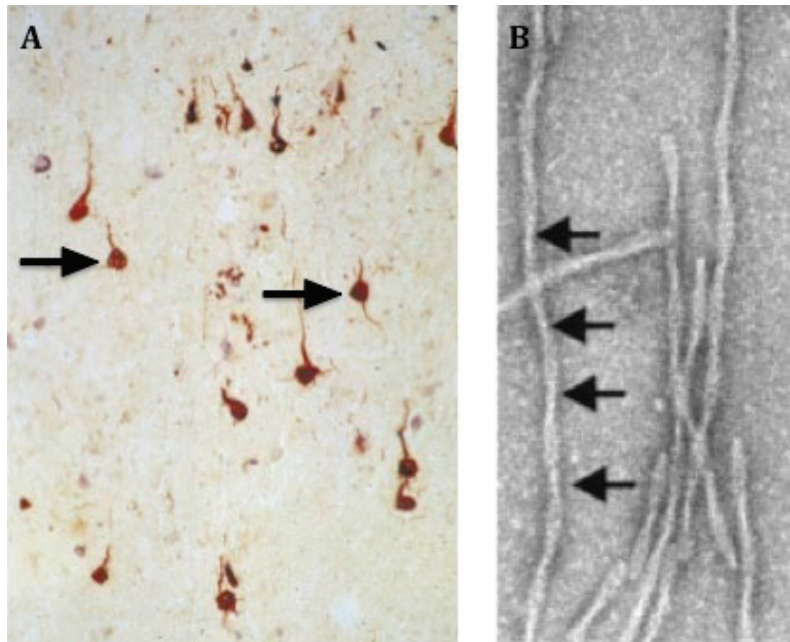
A $\beta$  de détériorer de façon importante la mémorisation dans un contexte de peur conditionnée (Kittelberger, et al., 2012). D'autre part, la présence de peptides A $\beta$  a été mise en évidence à l'intérieur des neurones (Takahashi, et al., 2004). Enfin, une équipe a réalisé un modèle de rats transgéniques ayant une accumulation intraneuronale d'oligomères A $\beta$ . En plus de montrer un déficit de mémoire visuelle, ces rats présentaient une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau en l'absence de plaques amyloïdes extracellulaires (Echeverria, et al., 2004). Ainsi, un changement de paradigme s'est effectué durant cette dernière décennie aboutissant à une nouvelle hypothèse selon laquelle les déficits de mémoire de la MA seraient dus à de petits peptides A $\beta$  solubles et toxiques qui perturberaient des synapses particulières (pour revue Ferreira et Klein, 2011).

## ii. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les DNF sont des agrégats intraneuronaux de nature protéique. Elles sont formées par l'accumulation de neurofilaments anormaux dont le constituant principal est la protéine tau anormalement phosphorylée (Figure 3).

Cette protéine tau est un des constituants des neurofilaments, elle est associée aux microtubules qui forment le cytosquelette des neurones, et en régule la dynamique. Un seul gène code cette protéine, il est formé de 16 exons et situé sur le chromosome 17. Six isoformes de la protéine tau, générés par épissage alternatif, co-existent dans les neurones. La protéine tau est une phosphoprotéine dont environ 20 % des aa sont des sites potentiels de phosphorylation (résidus serine, thréonine et tyrosine) (pour revue Stoothoff et Johnson, 2005). Des phosphorylations anormales provoquent l'agrégation des protéines tau en filaments appariés en hélice (PHF pour « paired helical filaments » en anglais) au lieu d'une agrégation aux microtubules. Il est à noter que toutes les isoformes de la protéine tau sont retrouvées hyperphosphorylées dans les PHF (pour revue Goedert, et al., 2006).

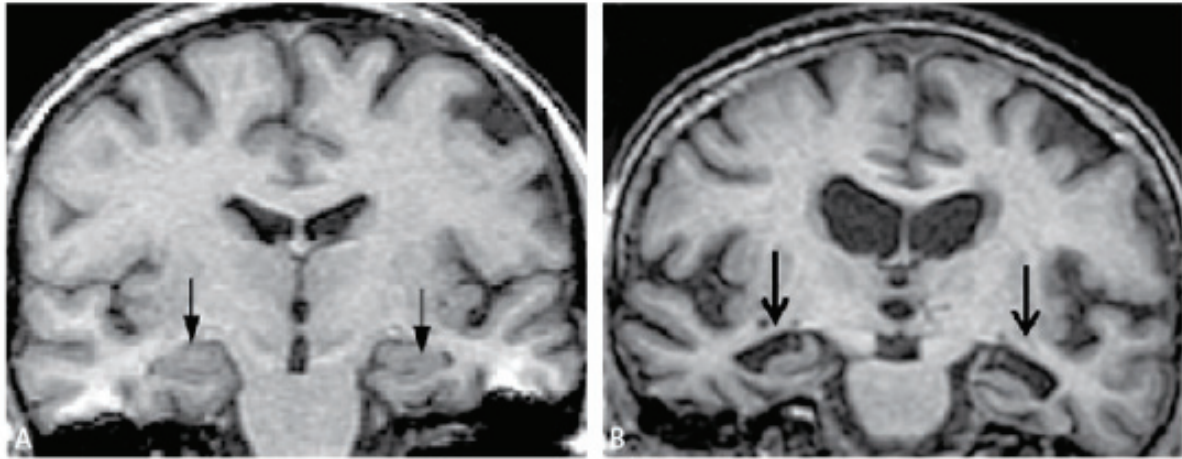
La MA n'est pas la seule à montrer ces anomalies de la protéine tau. En effet, à la fin des années 90 émerge le concept de « tauopathie » qui désigne les maladies ayant en commun la présence d'agrégats intraneuronaux de protéines tau anormalement phosphorylées (pour revue Buee, et al., 2000 ; Goedert, 1999).



**Figure 3 :** **A** Dégénérescences neurefibrillaires dans le cortex cérébral d'un patient Alzheimer, mises en évidence par immunohistochimie avec un anticorps anti-tau phosphorylation-dépendent (d'après Goedert, 1999). **B** Paires de filament en hélice formés par polymérisation de tau, visualisés en microscopies électroniques (d'après von Bergen, et al., 2000).

### iii. La perte neuronale

L'ensemble des lésions histopathologiques décrites ci-dessus aboutit *in fine* à une destruction synaptique et une perte neuronale. Cette perte, essentiellement de matière grise, est présente dans plusieurs structures cérébrales. Au niveau macroscopique, la perte neuronale se manifeste par une atrophie corticale, avec une diminution du volume des circonvolutions et un élargissement des sillons, ainsi que par une hypertrophie ventriculaire. L'hippocampe, structure impliquée dans les fonctions mnésiques montre une atrophie précoce (Baron, et al., 2001) (Figure 4). Une perte neuronale importante a également lieu dans les noyaux sous-corticaux. Les structures touchées sont notamment le noyau basal de Meynert (NbM) synthétisant l'acétylcholine, le locus coeruleus (LC) qui produit la noradrénaline, les noyaux du raphé dorsal (NRD) synthétisant la sérotonine et la substance noire (SN), lieu de synthèse de la dopamine (Lyness, et al., 2003). Aux stades avancés de la maladie, il en résulte une altération de ces systèmes de neurotransmission responsable d'une partie des symptômes.



**Figure 4 :** Comparaison de la taille des hippocampes entre un sujet sain (à droite) et un patient Alzheimer (à gauche) par IRM. Les hippocampes sont indiqués par les flèches noires. On remarque l'élargissement des sillons et la dilatation ventriculaire (d'après le site internet [www.cen-neurologie.fr](http://www.cen-neurologie.fr)).

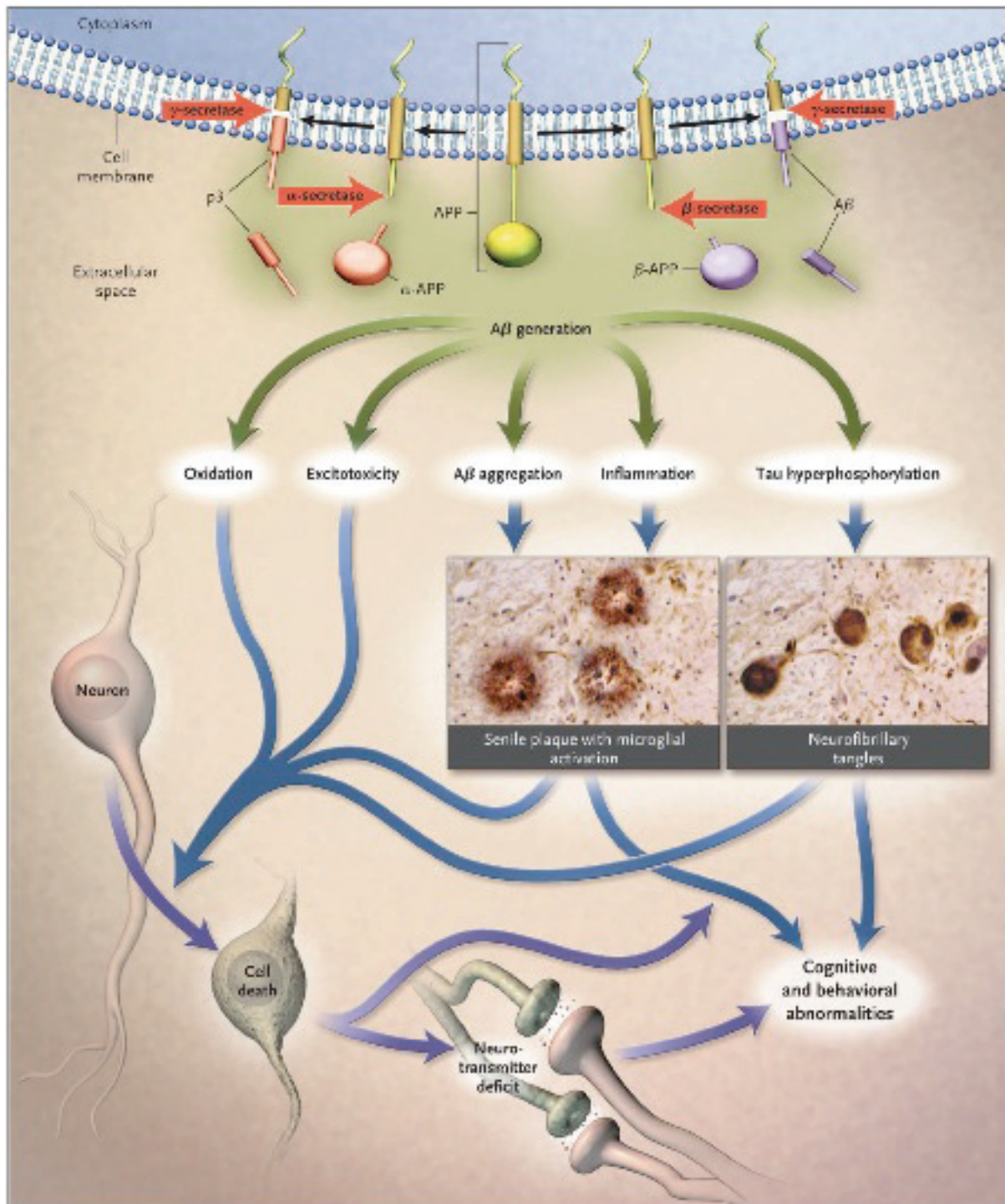
### **b) La progression des lésions**

Les liens qui existent entre le processus d'amyloïdogénèse et les DNF ne sont pas précisément connus. Aujourd'hui encore la communauté scientifique est divisée entre les tenants de la « cascade amyloïde » d'une part, qui fait jouer au peptide A $\beta$  le premier rôle dans le processus de la MA, et les « tauistes » d'autre part, qui considèrent que le processus de dégénérescence neurofibrillaire est l'élément déclenchant (Duyckaerts, 2004).

Pendant longtemps, de nombreux éléments firent pencher la balance du côté de l'hypothèse de la « cascade amyloïde ». Celle-ci propose qu'une altération de la protéolyse du peptide APP provoque une augmentation de la synthèse d'A $\beta$ 42 qui s'accumule puis s'agrège dans le cerveau. Ce phénomène conduit à la formation de dépôts diffus d' A $\beta$ 42 aux seins desquels va s'agréger à son tour le peptide A $\beta$ 40 pour former les plaques amyloïdes. Celles-ci vont initier une réponse inflammatoire, une toxicité synaptique et un stress oxydatif. Il en résulte une rupture du métabolisme normal des cellules avec une altération de la fonction des kinases et phosphatases et l'hyperphosphorylation de tau, dont découle la production de DNF. C'est cette cascade d'événements qui aboutirait à la neurodégénérescence (pour revue Hardy et Higgins, 1992) (Figure 5). La topographie des lésions amyloïdes est diffuse et évolue au cours de la maladie. Les dépôts diffus sont d'abord retrouvés dans les parties basales des régions

corticales, y compris celles qui sont dépourvues de pathologie neurofibrillaire, ce qui soutient l'hypothèse de la « cascade amyloïde ». De plus, des dépôts amyloïdes ont été observés précocement dans des cas de trisomie 21, avant que la pathologie fibrillaire ne soit détectée (Mann et Esiri, 1989).

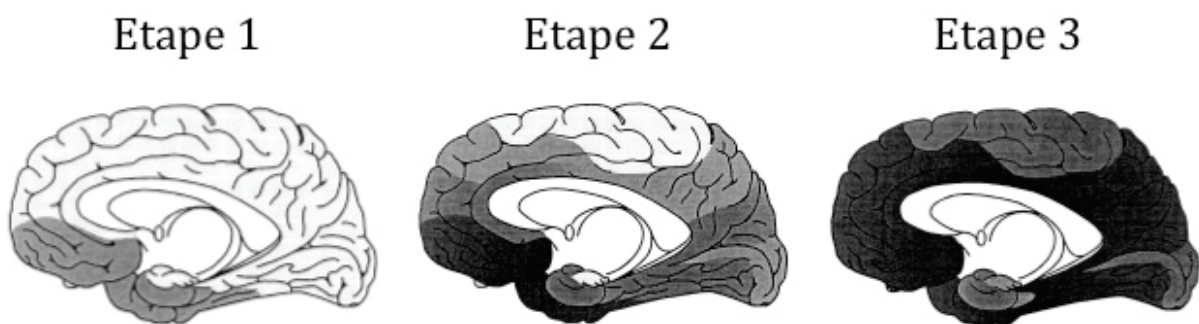
Les « tauistes » défient cette hypothèse en usant d'arguments de natures chronologiques et topographiques. En effet, il a été démontré que l'apparition des DNF dans la région transentorhinal précède l'apparition des dépôts amyloïdes (Braak et Braak, 1997). Au niveau topographique, nous savons que les plaques amyloïdes se déposent précisément au niveau des terminaisons des projections ascendantes et dépendent des connexions neuronales (Schonheit, et al., 2004). Enfin, l'équipe de Duyckaerts a prouvé que dans les cas les plus avancés de MA, les plaques finissent par disparaître dans la partie externe de la couche moléculaire du gyrus denté et laissent une bande spongieuse correspondant aux afférences entorhinales (Duyckaerts, et al., 1998b). L'ensemble de ces données indique une relation étroite entre plaques amyloïdes, DNF et connexions neuronales dans le complexe hippocampo-entorhinal. Les tenants de cette théorie arguent que cette relation ferait pencher la balance en faveur de la théorie « tauiste » qui place la pathologie tau en amont de la pathologie amyloïde. Cependant, le fait que des mutations dans le gène codant la protéine tau produisent des DNF sans plaque amyloïde (Ishihara, et al., 1999) alors que des mutations touchant le gène codant l'APP ou PS1 et PS2 sont capables de donner tant des plaques amyloïdes que des DNF (Lewis, et al., 2001) semble démontrer la prédominance de la pathologie amyloïde. A contrario, certaines données suggèrent que des formes « pre-filaments » solubles de tau pourraient être les formes les plus toxiques et pathologiques de la protéine tau agrégée (pour revue Brunden, et al., 2008). De plus, une équipe américaine a démontré récemment que l'injection stéréotaxique intra-hippocampique d'oligomères de la protéine tau détériore la mémoire de souris sauvages et induit des dysfonctions synaptiques et mitochondriales (Lasagna-Reeves, et al., 2011). Ainsi, il semble que la communauté scientifique n'ait pas fini d'être animée par ce débat, et de nombreux auteurs concluent de façon prudente, qu'il y a une synergie d'action entre les deux processus neurodégénératifs : la pathologie A $\beta$ , révélée par l'agrégation, et la propagation de neurone à neurone de la pathologie tau (Duyckaerts, 2004).



**Figure 5 :** Schéma de l'hypothèse de la « cascade amyloïde » (d'après Cummings, 2004).

Sur un plan spatio-temporel, l'évolution ultrastructurale des lésions amyloïdes fut compliquée à stéréotyper. En effet, si les stades avancés d'accumulation amyloïdes montrent un schéma de distribution assez constant, les stades précoces révèlent de fortes variabilités interindividuelles. La première étape est constituée de dépôts d'A $\beta$ , en faible densité, retrouvés dans l'isocortex, et particulièrement dans les parties basales

des cortex frontaux, temporaux et occipitaux. Ensuite, ce sont toutes les régions supérieures du néocortex qui sont envahies. Seules les aires primaires sensorielles et motrices sont encore saines, l'hippocampe est quant à lui moyennement envahi. Enfin, la dernière étape est caractérisée par la présence de plaques amyloïdes en densité élevée dans tout le cortex, les plaques ont gagné les structures sous-corticales telles que le striatum, le thalamus et l'hypothalamus (Braak et Braak, 1991) (Figure 6). Il est important de noter que la progression des lésions amyloïdes n'est pas corrélée à la nature des symptômes de la MA, ni à la sévérité de l'atteinte cognitive.

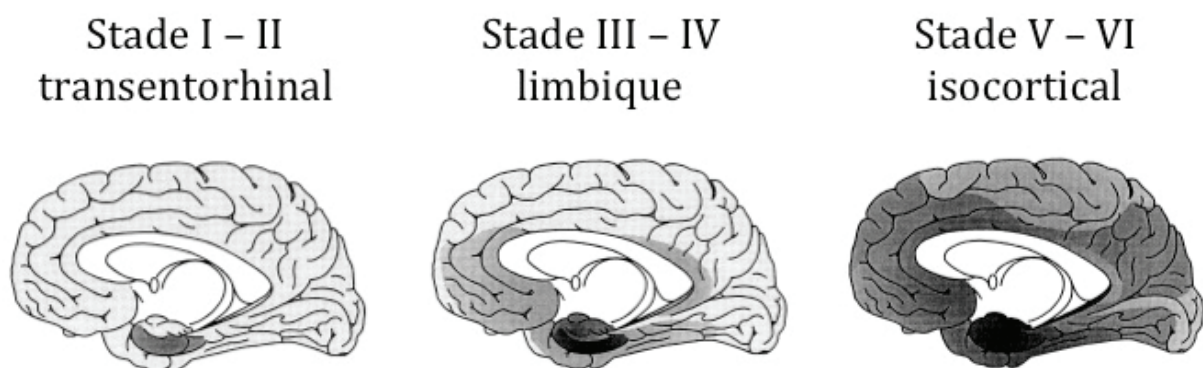


**Figure 6 :** Schéma représentatif de la propagation de la pathologie amyloïde (d'après Braak et Braak, 1997).

La pathologie tau, contrairement aux dépôts d' A $\beta$ , s'appuie sur un schéma d'évolution des DNF en stades bien identifiés, reproductibles et corrélés à l'évolution des signes cliniques (Braak, et al., 1994 ; Delacourte, et al., 1999 ; Nagy, et al., 1996). Il existe donc une hiérarchie lésionnelle, établie sur la base d'examen *post mortem*, qui progresse selon le schéma suivant: aire entorhinale, aire entorhinale + hippocampe, aire entorhinale + hippocampe + isocortex (Duyckaerts, et al., 1997 ; Duyckaerts, et al., 1998a ; Duyckaerts, et al., 1998b). L'échelle utilisée pour hiérarchiser la progression des DNF a été établie par Braak et Braak en 1991, elle comprend six stades dits de Braak I à VI (Figure 7).

Le stade I indique une invasion modérée et confinée à la région transentorhinale. Celle-ci désigne une zone de transition entre la zone entorhinale proprement dite et le cortex temporal adjacent. Le stade II est une aggravation du premier, avec présence de nombreuses DNF au niveau transentorhinale, une invasion limitée de l'hippocampe et une absence de changement au niveau isocortical. Ces deux stades sont regroupés sous le terme de « stades transentorhinaux ». Le stade III montre une atteinte sévère qui

progressive vers la région entorhinale. A ce stade apparaissent les structures « fantômes » qui témoignent de la disparition des neurones comportant le matériel neurofibrillaire. Les régions riches en DNF sont celles où la perte neuronale est abondante. L'hippocampe commence à être atteint au niveau de la partie 1 de la corne d'Ammon (CA1) et du subiculum. Le stade IV est marqué par une implication plus importante de l'hippocampe, une atteinte toujours plus sévère des régions transentorhinale et entorhinale, l'augmentation du nombre de « structures fantômes ». L'isocortex étant toujours plus ou moins indemne de lésions, ces deux stades sont regroupés sous le terme de « stades limbiques ». Le stade V a pour principale caractéristique l'atteinte du cortex cérébral, d'abord au niveau temporal, puis des aires associatives temporo-occipito-pariétales. Enfin, le stade VI montre une atteinte sévère de toutes les structures corticales ainsi que des noyaux sous-corticaux comme les noyaux gris centraux et la substance noire. L'atteinte des aires sensori-motrices du néocortex rend la démence extrêmement invalidante. Ces deux stades sont appelés « stades isocorticaux » (Braak et Braak, 1991).



**Figure 7 :** Schéma représentatif de la propagation de la pathologie tau (d'après Braak et Braak, 1997). Les stades sont appelés stades de Braak.

### 3. Manifestations cliniques

#### a) Symptomatologie

La MA fait partie des démences dégénératives. Les symptômes majeurs s'expriment au niveau cognitif avec un tableau clinique dominé par les troubles de la mémoire. Si ceux-ci constituent les premières manifestations cliniques dans la majeure partie des cas, les motifs de consultation, ainsi que les médecins spécialistes répondant à la demande des



patients ou des familles, restent variés. Ainsi, en début de maladie, les neurologues sont souvent consultés par l'entourage des patients, plus rarement par le patient lui-même, pour une plainte de mémoire, des troubles de l'exploration visuelle, du langage ou une désorientation spatiale. Les psychiatres sont eux consultés pour des tableaux dépressifs, des manifestations anxieuses voire des troubles du comportement. Enfin, les gériatres, presque exclusivement en structures hospitalières, voient les patients souvent en syndrome confusionnel favorisé par la survenue d'une pathologie surajoutée. Depuis quelques années, des équipes notent que certaines manifestations cliniques pourraient apparaître avant les troubles de la mémoire, c'est le cas de la perte de poids qui semble assez fréquente en début de maladie (Gillette Guyonnet, et al., 2007).

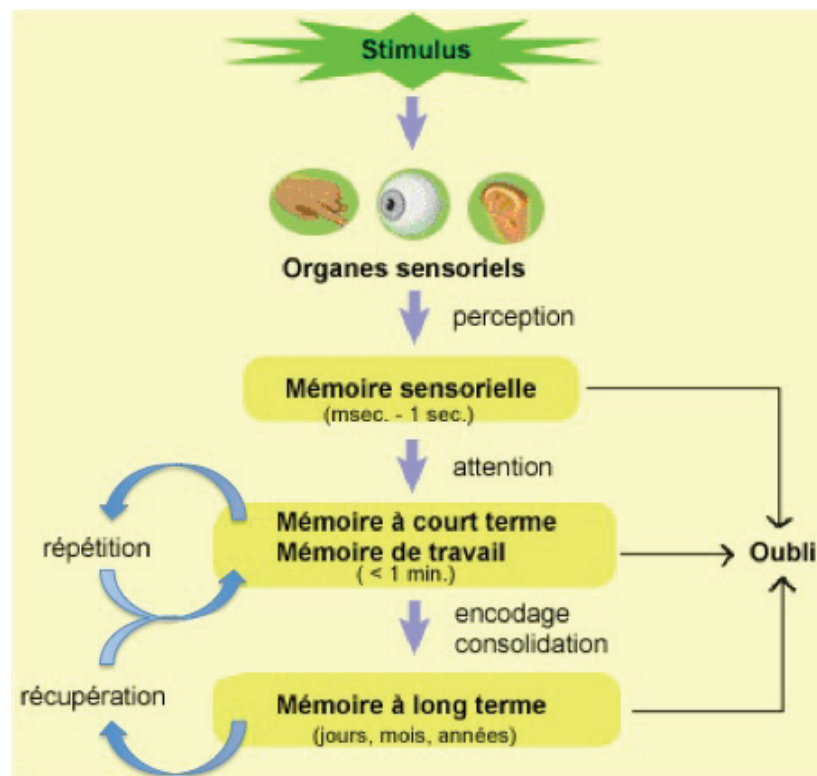
Le tableau complet de démence implique un ensemble de symptômes cliniques dont les principaux sont les suivants : amnésie (perte de la mémoire), aphasie (troubles du langage), apraxie (perturbation de la coordination motrice), agnosie (difficulté de reconnaissance et d'interprétation des objets familiers), apathie (fatigue physique et psychique).

Les troubles mnésiques sont d'apparition insidieuse et, de ce fait, sont volontiers méconnus ou banalisés car rapportés à l'âge. Ces troubles sont complexes et seul un examen neuropsychologique approfondi permet de déterminer la nature des systèmes impliqués. Les différents déficits observés dans la MA et les mécanismes sous-jacents sont décrits à partir de la classique dissociation entre mémoire à court terme et mémoire à long terme (Figure 8).

La mémoire à court terme est limitée dans le temps et de faible capacité. Fortement liée à l'attention, elle est typiquement utilisée dans une tâche qui consiste à restituer, dans l'ordre, une série d'éléments venant d'être énoncés. Bien que cette mémoire à court terme soit relativement bien conservée en début d'évolution de la MA, une sous-catégorie, qui permet d'effectuer des traitements cognitifs sur des éléments temporairement stockés, semble rapidement altérée dans la MA. Cette sous-catégorie est appelée mémoire de travail et sa dégradation est mise en évidence lorsque les patients ont des difficultés à effectuer des tâches nécessitant la manipulation de plusieurs données ou le maintien d'un contrôle attentionnel (Guériot-Milandre, et al., 1997).

La mémoire à long terme permet de garder une information en mémoire de quelques minutes à plusieurs années. Elle est divisée en mémoire explicite et implicite, elles-

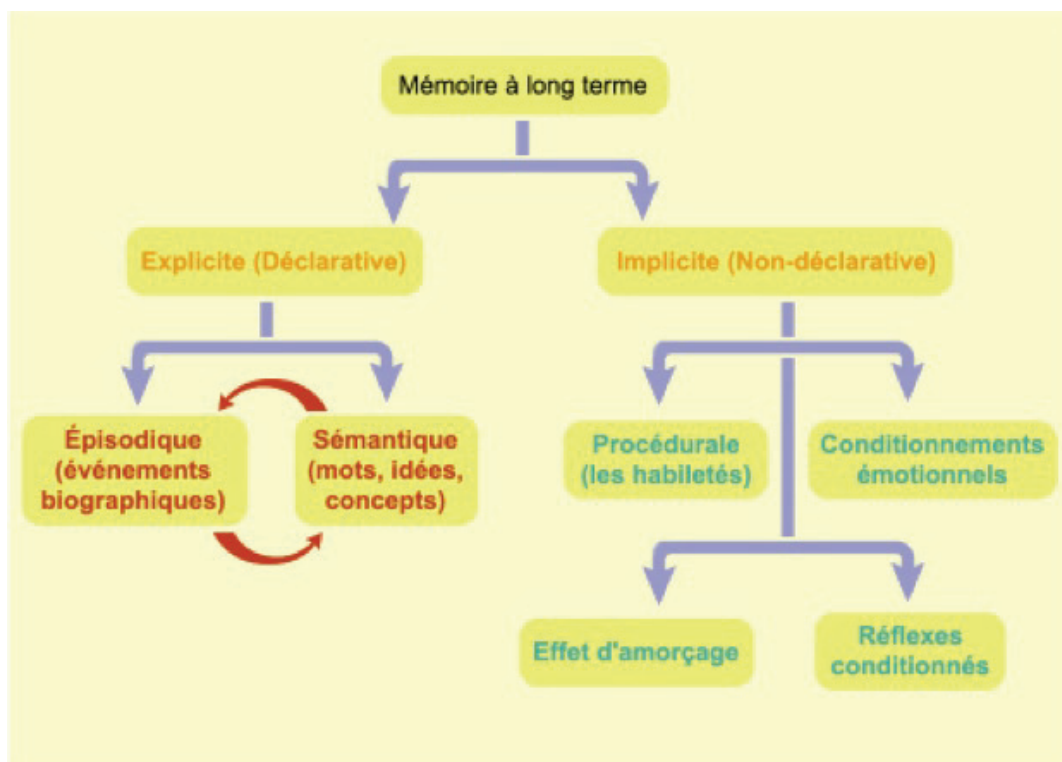
mêmes subdivisées en différents systèmes mnésiques. Cependant, la multiplicité des systèmes ne doit pas faire oublier que la mémoire humaine constitue une association de plusieurs sous-systèmes en constante interaction (Figure 9). C'est un de ces systèmes, appelé mémoire épisodique, qui est particulièrement atteint dans la MA. Cette mémoire épisodique est une mémoire personnelle, propre à chaque individu. Elle porte sur l'enregistrement d'évènements liés à un contexte spatio-temporel particulier et fortement corrélés à l'affect. L'atteinte de la mémoire épisodique dans la MA prédomine sur les faits récents. Ce trouble serait principalement dû à des perturbations de l'encodage auxquelles s'associent des troubles de la consolidation et du rappel (pour revue Eustache et Desgranges, 1995).



**Figure 8 :** Schéma représentant la conception actuelle des différents systèmes de mémoire et leurs relations (d'après le site internet [lecerveau.mcgill.ca](http://lecerveau.mcgill.ca)).

Les troubles du langage, regroupés sous le terme d'aphasie, sont les plus fréquents après ceux de la mémoire. Les deux facettes du langage, langage écrit et langage oral, sont touchés par la MA. Le langage écrit est atteint plus précocement que le langage oral et les différentes composantes de la production écrite ne sont pas altérées de façon homogène. On observe d'abord une altération des capacités narratives puis une

dysorthographe et, enfin, des perturbations du graphisme et de l'agencement spatial (Croisile, et al., 1996). L'atteinte du langage oral montre une grande hétérogénéité sémiologique interindividuelle, mais l'élément caractéristique de ces troubles reste les déficits sémantiques. Ces déficits débutent par des difficultés à trouver un mot dans la conversation ou le nom d'un objet. Puis la production linguistique se réduit progressivement et évolue vers un mutisme terminal où le tableau est celui d'une aphasie globale (Cardebat, et al., 1995).



**Figure 9 :** Schéma, représentant les sous-systèmes de la mémoire à long terme, qui souligne les interactions constantes, notamment entre la mémoire épisodique et la mémoire sémantique (d'après le site internet [lecerveau.mcgill.ca](http://lecerveau.mcgill.ca)).

Les désordres praxiques sont constants dans la maladie d'Alzheimer mais plusieurs études ont montré que leur moment d'apparition et leur type étaient variables. Ces perturbations gestuelles font partie du tableau clinique mais ils ne sont pas considérés comme spécifiques de la maladie (Kempler, 1988). L'apraxie est déclinée sous plusieurs formes : constructive, idéo-motrice, réflexive. La présence et la sévérité de cette apraxie réflexive (incapacité à réaliser, sur imitation, des gestes bimanuels sans signification) sont corrélées à la sévérité de la démence (Bakchine, et al., 1989). À terme, les troubles praxiques vont entraîner des difficultés à réaliser les gestes de la vie courante et une

détérioration des activités propres à chaque patient et ainsi conduire à leur abandon. Ils réduisent l'autonomie de façon importante, et au stade terminal, l'apraxie touche les gestes élémentaires ; on peut observer une apraxie tronculaire où le patient ne peut plus positionner son corps correctement (Guériot-Milandre, et al., 1997).

L'agnosie est essentiellement visuelle et survient en l'absence de tout déficit visuel élémentaire. Les patients présentent des difficultés à reconnaître les images d'objets, puis les objets eux-mêmes. Avec l'évolution de la maladie, les patients finissent par ne plus reconnaître les visages même familiers. On parle de prosopagnosie. Ces troubles de la reconnaissance des visages peuvent conduire à des troubles du comportement.

Enfin, l'apathie, définie cliniquement comme une réduction des comportements intentionnels en rapport avec un défaut de motivation est retrouvée fréquemment chez les patients souffrant de MA. Elle est à distinguer de la dépression et doit évoquer une cause sous-jacente : une dépression réelle, une iatrogénie médicamenteuse (sédatifs, neuroleptiques).

Ces symptômes majeurs sont accompagnés d'autres troubles qui ne sont pas d'ordre cognitif. En 1996, l'association de psychiatrie internationale (IPA) a regroupé un ensemble de symptômes sous le terme anglo-saxon de « Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia » (BPSD) (Lai, et al., 2011). Ces troubles non cognitifs font l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années car ils sont fréquents et ont un impact négatif important sur les activités de la vie quotidienne des patients et sur la qualité de vie, à la fois celle des patients, de leur famille, et des soignants (Lawlor, 2004).

Parmi ces BPSD, on retrouve les troubles de l'humeur, dont la dépression, avec une fréquence estimée à 30% des patients, et l'anxiété sont les plus couramment observés (pour revue Absher et Cummings, 1993 ; Echavarri, et al., 2013). La dépression peut être difficile à diagnostiquer car certains symptômes comme le désintérêt, l'apragmatisme, le ralentissement psychomoteur ou la réduction d'activité appartiennent aussi bien au registre dépressif qu'au registre démentiel. Les troubles de la personnalité et du comportement, tel que l'agitation et l'agressivité, sont lourds de conséquences et posent d'importants problèmes quant à la prise en charge des patients, que ce soit par le milieu familial ou en institution. De plus, ces comportements sont prédictifs d'un déclin cognitif rapide. Des troubles psychotiques sont aussi observés et se manifestent notamment par des hallucinations et des épisodes délirants. Enfin, bien que l'examen neurologique reste longtemps normal, des signes neurologiques apparaissent à un stade avancé de la

maladie. Ainsi, on peut observer la présence de réflexes archaïques, des signes extrapyramidaux à type de rigidité parfois associée à une akinésie, des myoclonies et des crises d'épilepsie. En outre, la présence de signes extrapyramidaux a aussi une valeur prédictive négative sur le déclin cognitif (Chui, et al., 1994).

Il est important de noter qu'il existe une grande hétérogénéité dans l'expression des symptômes de la MA, à la fois interindividuelle et entre les différentes formes cliniques de la maladie. De la même façon, la sémiologie varie selon les formes de MA, familiales ou sporadiques.

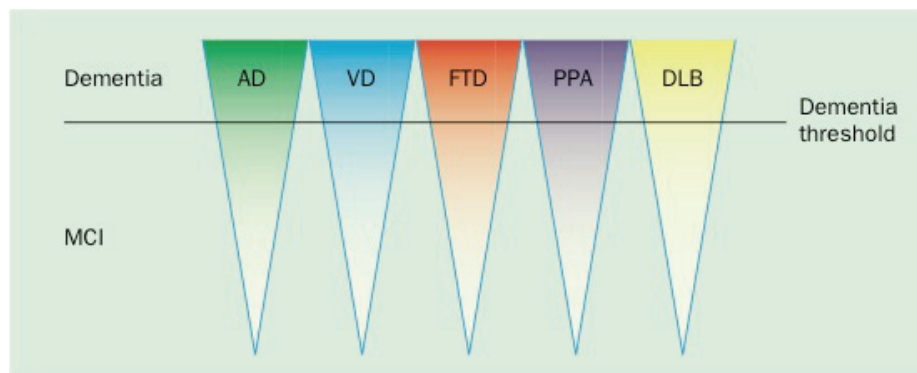
### ***b) Le concept de « Mild Cognitive Impairment » (MCI)***

Jusque dans les années 2000, la MA ne pouvait être diagnostiquée cliniquement que dans sa phase symptomatique. Or celle-ci apparaît uniquement lorsque la maladie est déjà bien avancée. C'est dans ce contexte qu'a été défini le concept de MCI (pour revue Petersen, et al., 1999). Il recouvre un état clinique où les patients se plaignent de leur mémoire, tout en restant relativement autonomes dans les activités de la vie quotidienne. Ces patients conservent un fonctionnement cognitif global satisfaisant, mais présentent un déficit mnésique objectivé par des performances à certains tests jugées anormales pour leur âge. Les critères de définition du MCI ont été proposés en 1995 par Petersen et ont été réévalués depuis (pour revue Petersen, et al., 2001) :

- Plainte mnésique confirmée par le patient ou son entourage proche.
- Préservation des activités de la vie quotidienne.
- Fonctionnement cognitif globalement normal.
- Absence de critère de démence.
- Troubles de la mémoire ou d'un autre domaine cognitif confirmés par un test neuropsychologique montrant un score (rapporté à l'âge et au niveau socio-culturel) inférieur à la moyenne.

Ce stade MCI s'inscrit dans l'idée d'un continuum progressif entre le vieillissement normal, le MCI et la MA. L'intérêt de ce concept est de mettre en lumière l'existence d'une forme pré-démentielle de la maladie et de posséder une certaine pertinence clinique, puisque ce stade MCI identifie des patients à risque de développer une

démence dans le futur. Cependant, le défaut de ce syndrome MCI est de regrouper des entités nosographiques hétérogènes qui, malgré leurs étiologies variées, peuvent partager des critères communs (Figure 10). Ceci pose des difficultés, autant pour prédire la progression clinique des patients que pour mettre au point une approche thérapeutique spécifique. C'est pourquoi il a été proposé de subdiviser le concept de MCI selon les maladies spécifiques sous-jacentes (Dubois, 2000). Pour la MA, le terme de MCI de type Alzheimer regroupe les patients qui ont les caractéristiques de MCI associées à un syndrome amnésique de type hippocampique. Ce dernier est caractérisé par un trouble du rappel libre spécifiquement lié à une altération des circuits de la mémoire, elle-même provoquée par une atteinte des régions temporales internes (cortex entorhinal, voie perforante, hippocampe). Certains tests qui permettent de contrôler l'enregistrement d'une information par le patient, et d'en faciliter la récupération au moyen d'indices sémantiques, révèlent ce profil mnésique hippocampique.



**Figure 10 :** Schéma représentant les maladies pouvant causer un syndrome MCI. La maladie peut être identifiée le plus souvent avant le stade clinique de démence (AD : « alzheimer disease », VD : « vascular dementia », FTD : « frontotemporal dementia », PPA : « primary progressive aphasia », DLB : « dementia with lewy bodies ») (d'après Dubois et Albert, 2004).

### **c) Les différents stades de la MA**

Le terme de MA se réfère classiquement au processus pathologique défini par des lésions neuronales spécifiques, les plaques séniles et les DNF, associées à une perte neuronale et synaptique, et fréquemment accompagnées d'une angiopathie amyloïde cérébrale (1997). Cependant, ce processus peut ou non devenir symptomatique. Ainsi, il a été proposé d'utiliser le terme de pathologie Alzheimer (PA) (traduit du terme anglo-saxon « Alzheimer's pathology ») pour désigner les mécanismes génétiques, cellulaires

et moléculaires qui sous-tendent la maladie. Cette PA peut être identifiée *post mortem* en l'absence de signe cognitif ou comportemental évident (Bennett, et al., 2006). Le manque de connaissances sur les liens de causalité entre le schéma neuropathologique et l'expression clinique de la maladie entretient la confusion à propos du terme de MA. C'est pourquoi, un nombre important d'experts internationaux propose de distinguer l'expression clinique de la MA et le processus physiopathologique désigné par le terme PA (Dubois, et al., 2010). Cette distinction, ainsi que les avancées majeures au niveau des outils de diagnostic biologique (les biomarqueurs caractéristiques de la PA seront abordés dans un chapitre suivant) et la finesse des tests neuropsychologiques, cognitifs et comportementaux, ont permis une redéfinition des différents stades de la MA.

Un intérêt croissant est accordé à la longue phase préclinique de la maladie qui distingue deux états de la MA. Ces « preclinical states of Alzheimer's disease » (AD) regroupent l'état « asymptotique à risque de MA » et la « MA présymptomatique ». Dans les deux cas, les patients ne montrent aucun signe clinique (cognitifs ou comportementaux) de la MA, et malgré cela, ces états sont considérés comme faisant partie de la maladie. En effet, l'état asymptotique à risque de MA peut être mis en évidence *in vivo* par l'imagerie cérébrale des plaques amyloïdes, qui révèle la présence de ces plaques, ou par un changement des marqueurs biologiques présents dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). En l'absence de connaissance sur la valeur prédictive de ces changements biologiques pour le développement futur de la maladie, cette phase asymptotique est qualifiée « d'état à risque de MA ». L'état appelé « MA présymptomatique » s'applique aux patients qui développeront une MA car ils sont porteurs de mutations génétiques à pénétrance complète. Ces personnes sont retrouvées dans des familles porteuses de mutations autosomiques dominantes monogéniques qui sont responsables de la MA.

Le terme de MA prodromale, également qualifiée d'état prédéméntiel de la MA, a été introduit au début des années 2000 (Dubois, 2000 ; Dubois et Albert, 2004) et désigne les patients qui présentent une phase symptomatique de la maladie. Pour appartenir à cet état prédéméntiel de la MA, les patients doivent répondre à deux caractéristiques : 1) présenter des troubles de la mémoire épisodique de profil hippocampique qui n'affectent pas les activités de la vie quotidienne, et ne permettent pas le diagnostic de démence. 2) présenter les changements physiopathologiques caractéristiques de la PA, mis en évidence par les biomarqueurs de la maladie (du LCR ou d'imagerie). Ce terme

disparaîtra peut être de cette nouvelle classification dans quelques années si on considère que la MA comprend à la fois les états démentiel et prédémentiel.

La MA démentielle, ou démence Alzheimer, correspond à la phase de la maladie pendant laquelle les symptômes cognitifs sont suffisamment sévères pour impacter les activités quotidiennes et le fonctionnement social des patients. Cette définition fait référence à un seuil de gravité au-delà duquel le patient passe du stade prédémentiel au stade démentiel. Malgré la difficulté d'établir ce seuil au cours de la progression de la maladie, il reste pertinent d'identifier un seuil démentiel pour les essais cliniques et les évaluations socio-économiques qui nécessitent une répartition standardisée des patients.

Le phénotype clinique le plus commun de la MA est appelé MA typique. Il est caractérisé par un déficit, significatif et progressif, de la mémoire épisodique, qui reste dominant aux stades avancés de la maladie. Ce déficit est suivi par d'autres troubles cognitifs ou neuropsychiatriques et le diagnostic est confirmé par un ou plusieurs biomarqueurs de la PA.

Les phénotypes cliniques rares, et néanmoins bien caractérisés, qui peuvent apparaître avec la PA sont regroupés sous le terme de MA atypique. Il peut s'agir de l'aphasie progressive primaire, de la démence sémantique, du variant frontal de la MA ou de l'atrophie corticale postérieure. Le diagnostic de MA est posé si un de ces tableaux cliniques est complété par la mise en évidence *in vivo* de biomarqueurs de la PA.

Enfin, cette nouvelle classification a pris en compte les patients Alzheimer qui présentent des comorbidités, typiquement les maladies cérébro-vasculaires et la démence à corps de Lewy. Ces patients sont regroupés sous le terme de MA mixte. Cependant, dans le but d'éviter une augmentation du nombre de cas de MA mixte qui n'aurait pas de réelle signification clinico-biologique, ce terme est restreint aux cas qui associent les caractéristiques cliniques des pathologies en question et les marqueurs diagnostiques qui montrent une étiologie mixte. Ceci exclut certains marqueurs qui ne permettent pas la distinction de deux processus pathologiques. Par exemple, l'augmentation de la concentration totale en protéine tau dans le LCR, biomarqueur de la PA, peut être retrouvée aussi dans les maladies cérébro-vasculaires. Ainsi ce biomarqueur doit être écarté du schéma diagnostique car d'autres sont suffisants pour établir ce diagnostic de MA.



De l'aveu même des auteurs, cette classification a vocation à évoluer avec les connaissances, mais son intérêt majeur est son application dans les essais cliniques de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique. En effet, les patients identifiés comme asymptomatiques à risque de MA ou ayant une MA présymptomatique pourraient rentrer dans des études visant à retarder l'apparition des signes cliniques. De même que les patients ayant une MA prodromale pourraient être inclus dans les essais ciblant spécifiquement la progression vers les stades avancés de la maladie (Dubois, et al., 2010).

## **4. Diagnostic**

### ***a) Critères diagnostiques***

Il est recommandé que le diagnostic de la maladie d'Alzheimer soit posé dès les premiers symptômes, car la précocité et la spécificité du diagnostic sont des facteurs cruciaux pour la prise en charge de la MA. Ce diagnostic nécessite une évaluation cognitive approfondie, réalisée de préférence dans le cadre d'une consultation mémoire spécialisée. De la même façon, une évaluation est également recommandée à l'entrée et en cours de séjour en établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD).

#### **i. Les critères diagnostiques majeurs**

Les standards diagnostiques qui prévalent sont ceux définis par le « National Institut of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and Related Disorders Association » (NINCDS-ADRDA) (McKhann, et al., 1984) et le « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders », 4<sup>ème</sup> édition (DSM-IV) publié en 1994 par l'association américaine de psychiatrie. Le DSM a été réactualisé en 2013 (DSM-V). Le DSM-V apporte des changements non négligeables, qui sont basés en grande partie sur la mise à jour des critères diagnostiques utilisés par les praticiens cliniques (ils seront abordés plus loin, cf **I.A.4.a**)iii.). Les critères du NINCDS-ADRDA sont cliniques et définissent un diagnostic probable de MA (Annexe 1). Ils reconnaissent spécifiquement le début insidieux des troubles cognitifs de la maladie en l'absence d'autre maladie cérébrale ou systémique qui pourrait causer la perte progressive de mémoire et les autres déficits cognitifs. Les critères du DSM-IV requièrent la présence

concomitante du déficit mnésique et de troubles cognitifs associés, à un terme suffisamment avancé pour impacter les activités quotidiennes des patients (Annexe 2). Ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, les troubles de la mémoire sont constants et s'associent de façon variable aux autres signes cliniques ce qui explique la grande variabilité des tableaux cliniques. Le diagnostic repose essentiellement sur l'examen clinique composé d'un interrogatoire approfondi, complété par une batterie de tests neuropsychologiques et cognitifs.

L'entretien initial est effectué avec le patient et, si possible après son accord, avec un accompagnant identifié capable de donner des informations fiables. L'interrogatoire porte sur plusieurs éléments dont les antécédents médicaux personnels et familiaux, les traitements antérieurs et actuels, le niveau d'éducation, l'activité professionnelle, l'histoire de la maladie, le changement de comportement et le retentissement des troubles sur les activités quotidiennes. Cet entretien est très important car il conditionne la prise en charge du patient. L'examen clinique doit apprécier l'état général et cardio-vasculaire du patient, les déficits sensoriels éventuels. La recherche de comorbidités est importante, qu'elles soient thymiques (dépression, anxiété) ou physiques (insuffisance rénale, trouble métabolique), et doit être effectuée au moment du diagnostic et lors de toute aggravation brutale des troubles cognitifs ou comportementaux. Puis, le retentissement des troubles cognitifs sur les activités de la vie quotidienne doit être apprécié à l'aide d'échelles évaluant les activités de la vie quotidienne.

## ii. Les tests neuropsychologiques

Le dépistage et l'analyse des troubles cognitifs se font grâce à des tests neuropsychologiques spécifiques. Ces épreuves sont nombreuses et aucun tests n'explore une seule fonction de manière isolée ce qui rend leur interprétation difficile. Le choix des tests neuropsychologiques validés, à effectuer dans le cadre d'une consultation spécialisée, est laissé à l'appréciation des médecins et neuropsychologues. Cependant les tests permettant l'évaluation de la sévérité de la démence les plus utilisés sont le « Mini Mental State Examination » (MMSE) (Folstein, et al., 1975) et le « Clinical Dementia Rating » (CDR) (Morris, 1993). Le MMSE est une échelle globale autorisant l'évaluation du statut cognitif des patients tout en proposant différentes sous-échelles qui évaluent l'orientation spatio-temporelle, la mémoire, l'attention, le langage et les

praxies constructives. Le caractère multifonctionnel, ainsi que la facilité et la rapidité de sa réalisation en font, aujourd'hui encore, un outil d'exploration majeur dans le dépistage et le suivi des troubles cognitifs liés à la démence. Le système de notation est simple, il suffit d'additionner les scores obtenus aux différents items du MMSE, ainsi le score peut varier de 0 à 30. Le score est à évaluer en fonction du niveau socio-professionnel et permet le suivi des patients. En France, le groupe de recherche et d'évaluation des outils cognitifs (GRECO) est chargé d'établir les standards d'évaluation (Derouesne, et al., 1999 ; Kalafat, et al., 2003). Le CDR est une échelle qui permet une semi-quantification de la sévérité de l'atteinte cognitive et ainsi la classification des patients selon leur degré de démence. L'examineur doit évaluer plusieurs secteurs cognitifs distincts : mémoire, orientation spatio-temporelle et jugement et résolution des problèmes. Puis il doit apprécier plusieurs comportements : socioprofessionnel, hygiène personnelle et comportement quotidien à la maison. Ensuite un algorithme génère un score qui rend possible la répartition des patients en cinq niveaux : les sujets sains ont un CDR de 0 alors qu'un CDR de 0.5 rend compte de troubles isolés de la mémoire correspondant au stade de MCI. Une démence légère est révélée par un score CDR 1, les troubles de la mémoire sont modérés mais les activités de la vie quotidienne commencent à être impactées et les plus complexes sont abandonnées. Lorsque le score atteint un CDR 2, la démence est dite modérée mais les troubles de la mémoire sont sévères. Les patients sont désorientés dans le temps et dans l'espace, les activités quotidiennes sont réduites aux plus simples, les patients sont dépendants en dehors de leur domicile. Le stade ultime est un CDR 3 qui correspond à une démence sévère où seuls quelques fragments mnésiques sont conservés, les patients sont totalement dépendants pour de nombreuses activités quotidiennes ainsi que pour l'hygiène personnelle. A ce stade, le maintien à domicile est impossible.

Les critères diagnostiques, précédemment décrits, validés par les communautés médicales et scientifiques n'autorisaient jusqu'à présent qu'un diagnostic probabiliste de la MA, et cela dans un contexte où il n'existait pas de biomarqueur diagnostique suffisamment fiable. Selon les critères du NINCS-ADRDA, le diagnostic de certitude repose sur une confirmation anatomo-pathologique du diagnostic clinique. Cet examen met en évidence la présence des plaques séniles et des DNF (Mudher et Lovestone,

2002). Cependant, ces études immunohistochimiques ne sont réalisées qu'en *post mortem* et ne présentent donc pas de bénéfice direct pour le patient.

A l'heure actuelle, des marqueurs distinctifs de la maladie sont reconnus, que ce soient les changements cérébraux structurels et métaboliques visualisés par imagerie, ou les variations des marqueurs biochimiques dosés dans le LCR. Ces marqueurs permettent une caractérisation plus précoce de la MA et ont poussé vers une redéfinition des critères diagnostiques de la maladie.

### iii. La mise à jour des critères diagnostiques

Il y a plusieurs facteurs qui soulignent la nécessité d'actualiser les critères diagnostiques de la MA. Tout d'abord, les critères du NINCDS-ADRDA, qui montrent une bonne sensibilité diagnostique, ont une spécificité insuffisante concernant la MA par rapport aux autres démences. Cette spécificité varie énormément selon les études, passant de 23 à 88 % (Kazee, et al., 1993 ; Varma, et al., 1999). En plus de la spécificité, un point important concernant le diagnostic est son caractère précoce, permettant une intervention thérapeutique qui sera plus efficace si elle apparaît tôt dans le processus physiopathologique (Greig, et al., 2005). D'autre part, les avancées techniques, en imagerie notamment, permettent une meilleure corrélation clinico-anatomique et ainsi une appréciation plus fine des différents phénotypes de la MA. Un autre écueil majeur des critères diagnostiques tels que définis par le NINCDS-ADRDA est l'ambiguïté inhérente à la distinction entre le stade MCI et la MA proprement dit. En effet, cette transition de MCI à MA est considérée comme le terme a priori de plusieurs études (Feldman, et al., 2004 ; Petersen, et al., 2005 ; Thal, et al., 2005). Cependant, le caractère binaire de ce résultat, conversion versus non conversion, ne correspond plus au consensus actuel qui considère qu'il y a un continuum entre les différents stades de la MA. Enfin, depuis l'établissement de ces critères en 1984, des avancées déterminantes ont été réalisées dans la recherche et l'identification des biomarqueurs, véritables signatures topographique et biochimique de la PA. Le prochain chapitre sera consacré à ces biomarqueurs qui ont bouleversé la définition de la MA.

L'ensemble de ces arguments a mené un groupe d'experts internationaux, sous l'impulsion du Pr. Dubois (la Pitié Salpêtrière, Paris), à redéfinir les critères de diagnostic de la MA. Le critère majeur reste la présence d'un trouble précoce de la mémoire épisodique. Ce trouble est caractérisé par des changements mnésiques

progressifs, rapportés par le patient ou un de ses proches et évoluant depuis plus de six mois ; il doit être objectivé par les tests neuropsychologiques validés pour détecter des déficits de l'encodage et du rappel. Une absence d'amélioration par « l'indigage » assure une fiabilité certaine dans l'identification d'une MA prodromale (Ivanou, et al., 2005). Ce trouble peut être isolé ou associé à d'autres déficits cognitifs. Pour établir le diagnostic de MA probable, ce critère majeur doit être associé à au moins un des quatre marqueurs de la PA :

- Présence d'une atrophie des structures du lobe temporal médian (LTM) visualisée grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM).
- Dosage quantitatif anormal des biomarqueurs du LCR : faible concentration en peptide amyloïde A $\beta$ 42, concentration élevée en protéine tau totale (t-tau) ou en protéine tau phosphorylée (p-tau), ou combinaison des trois.
- Schéma spécifique de neuroimagerie fonctionnelle, réalisée par tomographie par émission de positons (TEP).
- Mise en évidence des mutations autosomiques dominantes (chromosomes 1, 14 et 21) de la MA chez un parent au premier degré.

Il existe des critères, de différents ordres, qui permettent d'exclure une MA. En effet, selon l'histoire de la maladie, un début brutal ou une coexistence précoce de symptômes type changements comportementaux ou convulsions excluent *de facto* une MA. Certaines caractéristiques cliniques telles que des symptômes extrapyramidaux précoces ou des déficits sensoriels sont incompatibles avec le diagnostic MA probable. Les maladies suffisamment sévères pour impacter la mémoire comme les épisodes dépressifs majeurs ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC), constituent aussi un critère d'exclusion du diagnostic de MA probable.

Pour finir, il est possible d'établir un diagnostic de certitude de MA. Pour cela, les signes cliniques typiques doivent coexister avec la mise en évidence anatomo-pathologique (par biopsie cérébrale ou autopsie) des lésions de la PA, telle que définie par le National Institut of Aging (NIA-Reagan) d'une part, ou avec la présence des mutations génétiques de la MA chez le patient d'autre part (1997 ; Dubois, et al., 2007).

Il est important de noter que les critères cités ci-dessus ont été développés dans un but de recherche biomédicale. En effet, sur un plan purement médical, les centres hospitaliers concernés par le diagnostic de MA ne possèdent pas forcément les infrastructures nécessaires à la détermination de tous les marqueurs de la PA. Il était donc vital de mettre au point des recommandations permettant le diagnostic de MA sur des critères cliniques uniquement. C'est pourquoi un groupe d'experts, mené par le « National Institute on Aging » américain a travaillé à la mise au point de ces recommandations. Ainsi, concernant le diagnostic de MCI dus à la MA, les critères cliniques restent l'élément principal. Un deuxième set de critères diagnostiques reposent sur l'utilisation des biomarqueurs qui permettent d'établir quatre niveaux de certitude, selon la présence et la nature des biomarqueurs (Albert, et al., 2011). Pour la démence Alzheimer, le diagnostic reste dans le cadre des critères cliniques majeurs rapportés auparavant, bien que les biomarqueurs puissent être un apport renforçant la spécificité (McKhann, et al., 2011).

### ***b) Les biomarqueurs***

C'est au cours des deux dernières décennies que les progrès les plus significatifs, concernant l'identification *in vivo* des preuves laissées par la PA, ont été réalisés grâce à l'identification de biomarqueurs fiables. Une fois validées, ces biomarqueurs spécifiques, ont poussé vers la redéfinition du concept de la MA car ils sont désormais intégrés dans la démarche diagnostique (Fagan, et al., 2006 ; Jagust, et al., 2009). En effet, les biomarqueurs du LCR, sont fortement corrélés aux lésions neuroanatomiques de la MA (Buerger, et al., 2006 ; Tapiola, et al., 2009). Parallèlement, il y a une forte corrélation entre le volume du LTM, mesuré par IRM, et les performances de la mémoire épisodique (Deweert, et al., 1995). Ces biomarqueurs peuvent être divisés en deux catégories : physiopathologiques et topographiques.

#### **i. Biomarqueurs physiopathologiques**

Les marqueurs physiopathologiques correspondent aux deux étiologies distinctes du processus neurodégénératif : l'amyloïdose qui aboutit aux plaques séniles et la taupathie qui donne les DNF. Ces biomarqueurs incluent à la fois les mesures des concentrations

en peptide A $\beta$ 42, en protéines tau (t-tau et p-tau) dans le LCR, et l'imagerie TEP des plaques amyloïdes par des composés comme le « Pittsburg compound B » (PIB).

### ***Dosage des protéines dans le LCR***

L'autopsie de patients atteints de la MA a révélé que la présence des plaques amyloïdes corrèle avec une concentration *ante mortem* réduite en peptide A $\beta$ 42 dans le LCR (Tapiola, et al., 2009). De plus, la visualisation *in vivo* des plaques amyloïdes, grâce au PIB, correspond à un faible tau d' A $\beta$ 42 dans le LCR (Forsberg, et al., 2008). Ces données suggèrent que le taux d' A $\beta$ 42 dans le LCR reflète le taux cérébral de fibrille A $\beta$ 42 et la charge en plaques amyloïdes. L'explication souvent avancée de ce phénomène est que l'agrégation du peptide A $\beta$ 42 en fibrilles puis en plaques entraîne la rétention de ce peptide dans le parenchyme cérébral et diminue sa diffusion dans le LCR (Blennow, et al., 2010). De fait la sensibilité diagnostique du dosage de A $\beta$ 42 est de 86 %, pour une spécificité de 90 % (Dubois, et al., 2007).

En ce qui concerne les protéines tau, plusieurs études ont montré l'augmentation des concentrations moyennes de tau dans le LCR au cours de la MA, et ce depuis Vandermeeren en 1993 (Vandermeeren, et al., 1993). La connaissance de la physiopathologie de la taupathie a mené à s'intéresser à la protéine tau totale ainsi qu'à la protéine phosphorylée. Pour la concentration de t-tau en particulier, un taux élevé a été corrélé à une conversion rapide du MCI vers la MA, ainsi qu'à un déclin cognitif accéléré et un taux de mortalité élevé chez les patients Alzheimer (Blom, et al., 2009 ; Samgard, et al., 2010 ; Wallin, et al., 2009). Cependant, cette augmentation de t-tau dans le LCR n'est pas spécifique de la MA et a été retrouvée dans certains troubles caractérisés par une dégénération neuronale rapide comme la maladie de Creutzfeld-Jacob (Otto, et al., 1997). Ainsi lorsque l'on regroupe les résultats de 36 études qui totalisent 2500 patients, la concentration de t-tau dans le LCR montre une sensibilité de 81 % et une spécificité de 90 % dans la discrimination de patients Alzheimer par rapport à des patients contrôles (Blennow et Hampel, 2003). Lorsque l'on évoque le dosage de la protéine tau dans le LCR comme élément diagnostique de la MA, il ressort que la forme phosphorylée de tau semble refléter à la fois l'état de phosphorylation de tau et la formation de DNF au niveau central (Blennow, et al., 2010). Plusieurs épitopes de p-tau sont étudiés (thréonine 181, thréonine 231, sérine 235 ou 199, etc) de façon

isolés ou combinés (Blennow et Hampel, 2003). Il ressort de plusieurs études, que le dosage de p-tau dans le LCR a une sensibilité de 80 % et une spécificité de 92 % (Dubois, et al., 2007). Certaines études suggèrent que l'utilisation principale de p-tau serait de différencier la MA d'autres types de démence. (Hampel, et al., 2004 ; Koopman, et al., 2009). A l'heure actuelle, la routine clinique inclue une combinaison de ces trois biomarqueurs du LCR, diminution de A $\beta$ 42 et augmentation t-tau/p-tau. En effet, malgré les inconvénients de cet examen, notamment le caractère invasif de la ponction lombaire et les biais potentiels des phases pré-analytique et analytique, la combinaison des trois facteurs augmente la sensibilité entre 85 et 94 % et la spécificité entre 84 et 100 %. Certaines équipes intègrent les différents dosages dans une formule et calculent un score pour établir un profil du LCR des patients souffrant de la MA (Visser, et al., 2009).

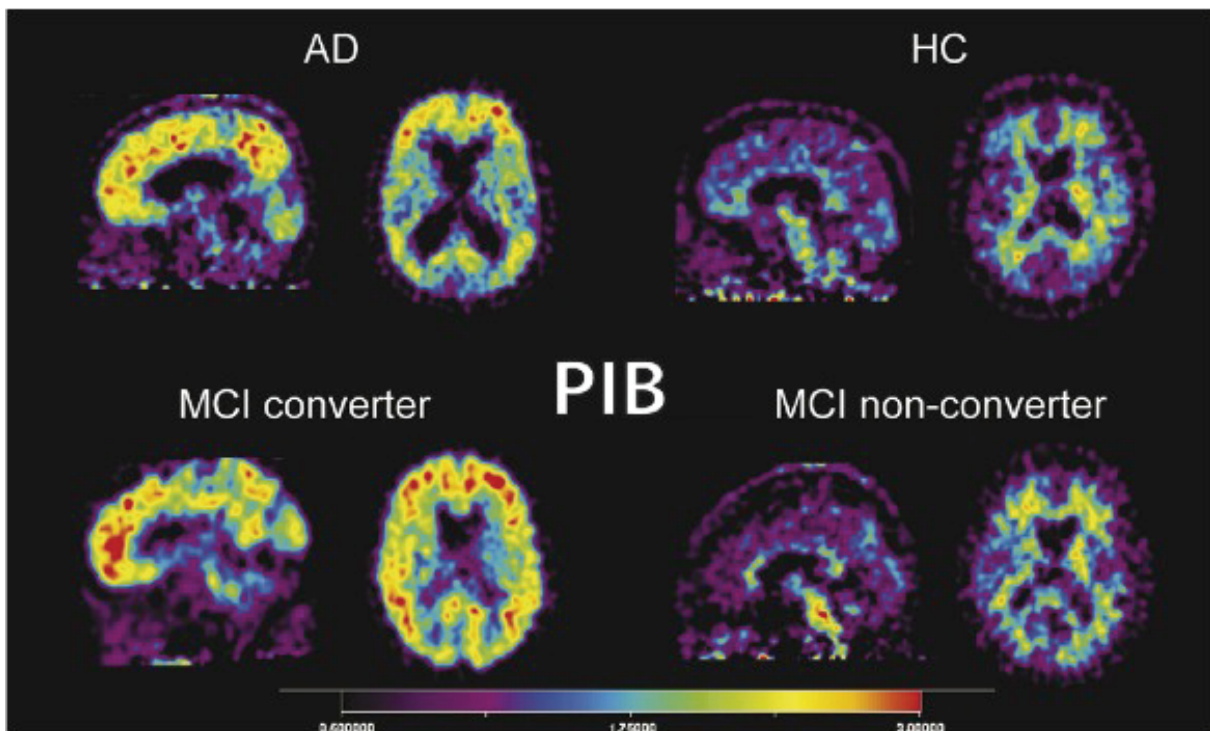
En France, les données les plus récentes concernant le dosage de ces protéines font état de variations importantes de la sensibilité et de la spécificité selon les centres hospitaliers (Lehmann, et al., 2013). Les auteurs avancent plusieurs raisons : lors de la phase pré-analytique, notamment le type de plastique utilisé dans le tube de prélèvement, et lors de la phase analytique, selon le seuil de détection retenu. De plus, la détection de plus en plus fréquente de pathologies mixtes (Alzheimer associée à d'autres démences) fait baisser la spécificité des dosages protéiques lorsqu'ils sont isolés. Ainsi à Lyon, le dosage de l' A $\beta$ 42 montre une sensibilité de 81 %, mais une spécificité de seulement 58 %. Pour le dosage de t-tau, la sensibilité est de 88 % et la sensibilité de 71 %. Enfin, le dosage de p-tau possède une sensibilité de 88 % et une spécificité de 75 %. Cette étude confirme la nécessité d'utiliser une combinaison des trois dosages.

### ***Imagerie TEP des plaques amyloïdes***

Depuis plus d'une dizaine d'années maintenant, d'énormes efforts, dans le domaine de l'imagerie médicale, ont été consacrés à la mise au point de traceurs radioisotopiques permettant la visualisation *in vivo* des lésions caractéristiques de la MA. Les plaques amyloïdes ont été les premières à être ciblées par ces traceurs marqués avec des isotopes radioactifs, et c'est en 2004 que fût conduite la première étude clinique par l'équipe de Klunk et Mathis à Pittsburg. Elle a été réalisée en imagerie TEP grâce à un traceur radiomarqué au carbone 11 : le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, celui-ci dérive de la thioflavine T, un colorant fluorescent des plaques amyloïdes (Figure 11). Cette étude, réalisée sur 16



patients Alzheimer comparés à 9 sujets sains, a montré une différence significative dans l'accumulation du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  au niveau cortical et sous-cortical entre les patients atteints de la MA et les sujets sains (1,5 à 1,9 fois supérieur). Aucune différence entre ces deux populations n'a été relevée dans les régions du pons et de la substance blanche (Klunk, et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Kemppainen, et al., 2006 ; Ziolkko, et al., 2006). De plus, il a été montré que des patients MCI ayant progressé vers une MA présentaient une accumulation cérébrale de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  supérieure à ceux n'ayant pas développé de MA (Forsberg, et al., 2008 ; Li, et al., 2008). A l'heure actuelle, il est admis que l'accumulation du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ , visualisé en TEP, est un marqueur prédictif du déclin cognitif et de la progression vers une MA symptomatique des personnes âgées ne présentant pas encore de trouble cognitif (Morris, et al., 2009 ; Resnick, et al., 2010).



**Figure 11 :** Images TEP de la fixation cérébrale du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  chez un patient Alzheimer (AD) en comparaison à un sujet contrôlé (HC), ainsi que chez un patient MCI ayant évolué vers une MA (MCI convertir) en comparaison à un patient MCI n'ayant pas évolué (MCI non-converter). On observe l'accumulation de la charge amyloïde chez les patients AD et les MCI convertir en comparaison des sujets témoins HC et MCI non-converter (Forsberg, et al., 2008).

D'autres radioligands ont été développés à la suite des premiers résultats (pour revue Mathis, et al., 2012), dont certains avec succès :  $[^{18}\text{F}]\text{AV-45}$  et  $[^{18}\text{F}]\text{BAY94-9172}$  (Choi, et

al., 2009 ; Rowe, et al., 2008). Un de ces radiotraceurs a particulièrement retenu l'attention, il s'agit du [<sup>18</sup>F]FDDNP. En effet, ce dernier a montré la capacité de lier *in vivo* les deux lésions caractéristiques de la MA, les plaques amyloïdes et les DNF (Agdeppa, et al., 2001 ; Shoghi-Jadid, et al., 2002). Il a été montré un marquage dans les régions connues pour être touchées par les deux lésions caractéristiques de la MA (notamment hippocampe et cortex entorhinal). De plus, une étude semble prouver que le [<sup>18</sup>F]FDDNP est capable de différencier les patients MCI des patients ayant une MA et des personnes sans trouble cognitif (pour revue Small, et al., 2006). Cependant, l'ambivalence du marquage au [<sup>18</sup>F]FDDNP révèle un manque de spécificité qui est dommageable pour le développement du traceur et son utilisation potentielle en clinique. A l'heure actuelle, un certain nombre d'équipes tentent de développer des marqueurs radioisotopiques spécifiques de la protéine tau ou des DNF (Xia, et al., 2013).

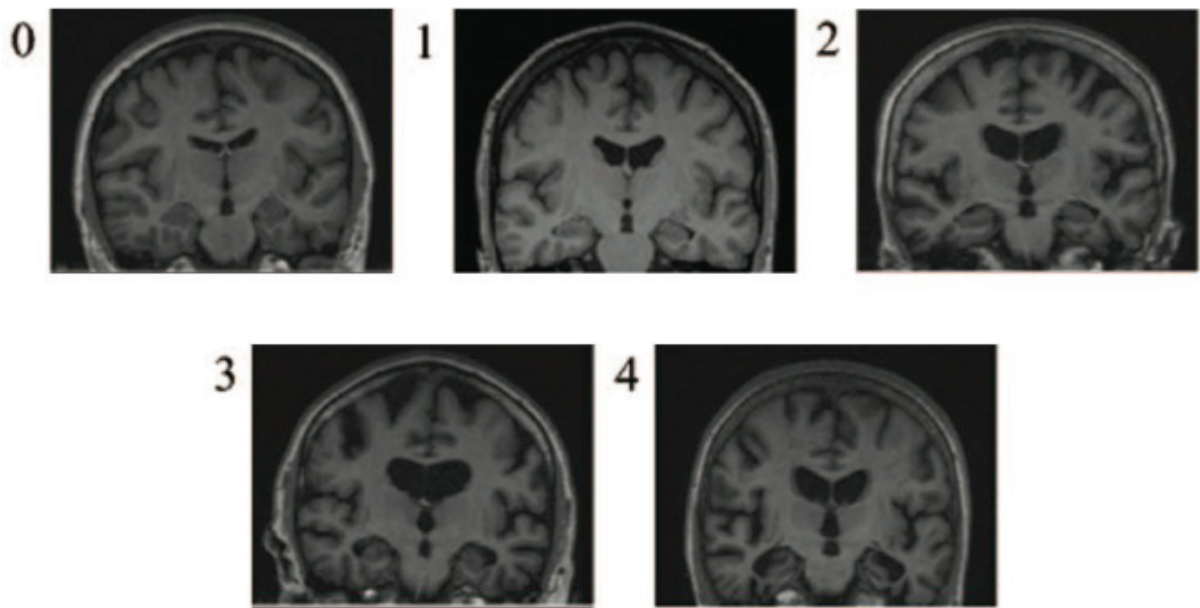
Ainsi, l'imagerie TEP au [<sup>11</sup>C]PIB est aujourd'hui intégrée aux critères diagnostiques du NINCDS-ADRDA remis à jour en 2007 (Dubois, et al., 2007). De plus, elle est un outil fondamental pour l'évaluation des thérapeutiques qui visent à réduire la pathologie amyloïde, notamment présente dans la MA. Cependant, l'inconvénient majeur de ce traceur est la demi-vie (20 minutes) du carbone 11. C'est pourquoi certains laboratoires ont développé des analogues du PIB, marqués au fluor 18. Nous avons déjà cité le [<sup>18</sup>F]AV-45 ou [<sup>18</sup>F]Florbetapir. Ce traceur, développé par les laboratoires Lilly, est actuellement commercialisé. Les résultats des études d'imagerie TEP réalisées avec le [<sup>18</sup>F]AV-45 sont fortement corrélés aux résultats obtenus avec le [<sup>11</sup>C]PIB (Landau, et al., 2013). De plus, les dépôts amyloïdes détectés avec le [<sup>18</sup>F]AV-45, chez des individus âgés non déments, sont liés à des troubles de la mémoire épisodique (Sperling, et al., 2013). Le deuxième traceur fluoré est le [<sup>18</sup>F]BAY94-9172 ou [<sup>18</sup>F]Florbetaben, développé par Bayer Schering. Ce traceur possède les mêmes sites de fixation que le [<sup>11</sup>C]PIB, mais avec une affinité plus faible. Malgré cela, il semble efficace dans la discrimination des patients Alzheimer (Villemagne, et al., 2012). Enfin, le dernier des trois traceurs fluorés des plaques amyloïdes est le [<sup>18</sup>F]Flutemetamol. Celui-ci, issu des laboratoires GE Healthcare, possède une forte affinité pour les plaques amyloïdes. Il a une structure chimique identique au PIB avec un atome de fluor 18 en plus. Ainsi, il possède la même cinétique que le PIB, avec une métabolisation rapide et une qualité d'images maximale 90 minutes après l'injection (pour revue Herholz et Ebmeier, 2011).

## ii. Biomarqueurs topographiques

Les marqueurs topographiques sont utilisés pour évaluer les changements cérébraux moins spécifiques qui corrént avec la distribution régionale de la PA. Il s'agit de l'atrophie du LTM et de la réduction du métabolisme du glucose dans les régions temporo-pariétales (Holland, et al., 2009 ; Patwardhan, et al., 2004). Ces marqueurs ont une valeur non négligeable car ces changements structuraux du cerveau correspondent précisément aux dépôts des DNF quantifiés par les stades de Braak (Whitwell, et al., 2008). Ils font tous les deux appel à des techniques d'imagerie médicale, basées sur la résonance magnétique nucléaire pour la mesure de l'atrophie du LTM, et sur l'imagerie fonctionnelle TEP au [<sup>18</sup>F]-2-fluorodésoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) pour la mesure du métabolisme glucidique cérébral.

### ***Atrophie du LTM mesurée par IRM***

L'atrophie du LTM mesurée par IRM (imagerie par résonance magnétique) est fréquente chez les patients Alzheimer (71 à 96 % selon les degrés de sévérité), elle est retrouvée aussi chez les patients MCI (59-78 %) et beaucoup moins fréquente chez les témoins âgés (29 %) (De Leon, et al., 1997) (Figure 12). De nombreuses études réalisées en IRM, sur la MA, s'intéressent de façon qualitative ou quantitative, à l'atrophie cérébrale (Apostolova, et al., 2006 ; Visser, et al., 2002), à la mesure du volume cérébral (Singh, et al., 2006) ainsi qu'à la mesure de la densité de matière grise, grâce à une technique d'analyse d'image voxel à voxel, la « Voxel Based Morphometry » (VBM) (Chetelat, et al., 2005). Une méta-analyse des données obtenues par VBM montre que l'atrophie du LTP, et notamment de l'hippocampe, est un bon marqueur prédictif de la conversion de MCI vers une MA (Ferreira, et al., 2011). De plus, il y a une forte corrélation entre le volume du LTP et les performances de la mémoire épisodique (Deweert, et al., 1995). Enfin, les mesures qualitative ou quantitative du LTM contribuent, indépendamment des tests mnésiques, à l'identification des patients ayant une MA prodromale (Korf, et al., 2004). Cependant, la précision de l'identification des MA prodromales augmente de 88 à 96 % lorsque la mesure du volume du LTM est associée aux tests neuropsychologiques (Visser, et al., 1999).



**Figure 12 :** Evaluation visuelle de l'atrophie du LTM sur une coupe IRM. Echelle de 0 (pas d'atrophie) à 4 (stade terminal d'atrophie) (d'après Westman, et al., 2011).

Ainsi, l'atrophie du LTM mesurée par IRM est un critère diagnostique performant pour la MA. Malgré tout, son utilisation implique l'exclusion d'autres causes potentielles d'anomalie structurelle du LTM telles que l'ischémie bilatérale, la sclérose hippocampique bilatérale ou les épilepsies du lobe temporal (Dubois, et al., 2007).

Il existe aujourd'hui un d'autres techniques IRM, comme la technique de « cortical thickness » qui mesure l'épaisseur corticale, ou l'IRM de diffusion (DTI pour « Diffusion Tensor Imaging), qui font l'objet d'études multicentriques dans le cadre du diagnostique de la MA. L'IRM fonctionnelle de repos (« resting-state fMRI ») est aussi utilisée dans le diagnostique de la démence de type Alzheimer (pour revue Teipel, et al., 2013).

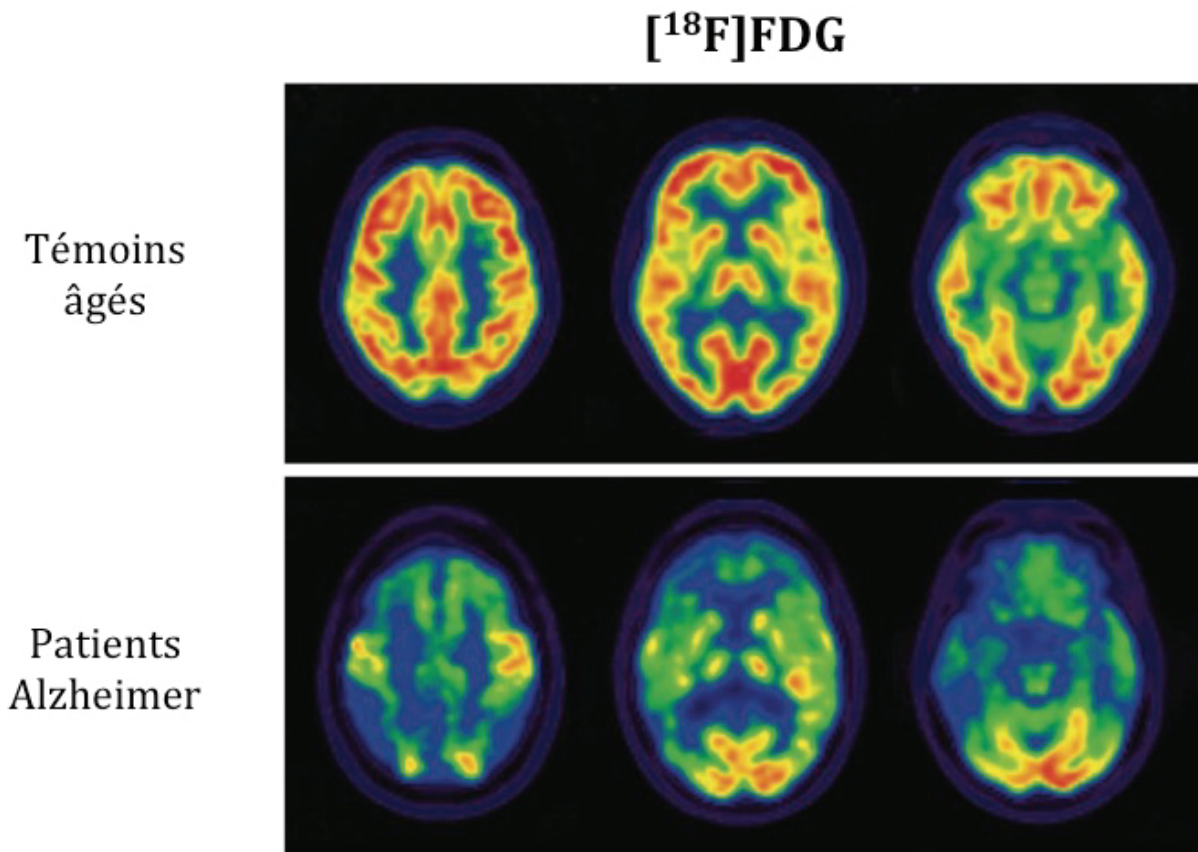
### **La TEP au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$**

L'imagerie TEP au  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  repose sur l'incapacité des cellules à métaboliser ce glucose désoxydé en position 2. Ainsi, celui-ci va s'accumuler à l'intérieur des cellules et permettre la reconstruction d'images qui reflète donc le métabolisme glucidique. La technologie TEP qui aboutit à l'obtention de ces images sera détaillée dans un chapitre ultérieur.

Une réduction du métabolisme du glucose, visualisée en TEP, dans les régions temporo-pariétales bilatérales et au niveau du gyrus cingulaire postérieur, est un critère diagnostique couramment décrit de la MA (Coleman, 2005) (Figure 13). Certaines

équipes suggèrent que l'hypométabolisme glucidique de la MA pourrait atteindre d'autres structures, particulièrement l'hippocampe (Mosconi, et al., 2005 ; Nestor, et al., 2003). Une méta-analyse basée sur neuf études rapporte que le critère diagnostique d'hypométabolisme temporo-pariétale peut différencier les patients atteints de MA des sujets contrôles avec une spécificité et une sensibilité de 86 % (Patwardhan, et al., 2004). Cependant, il faut prendre en compte que le diagnostic d'un hypométabolisme temporo-pariétal du glucose, dans le cadre d'une MA, varie avec le niveau d'éducation à tous les degrés de sévérité clinique (Stern, et al., 1992). La TEP au [<sup>18</sup>F]FDG permet de distinguer la MA des autres démences, notamment la démence à corps de Lewy avec une spécificité de 86 à 92 % et une sensibilité de 80 %, la démence fronto-temporale avec une sensibilité et une spécificité respectivement de 78 et 71 % (Koeppé, et al., 2005 ; Minoshima, et al., 2001). Enfin, la mesure d'un métabolisme glucidique réduit, au niveau cingulaire antérieur et postérieur et dans les cortex temporal médian, temporal et pariétal, permettrait la détection des MA prodromales avec une précision de 75 à 86 % (Mosconi, et al., 2004), et semble prédire le déclin cognitif des personnes saines vers le stade MCI puis une MA, confirmée par un examen *post mortem* (Berti, et al., 2010 ; Mosconi, et al., 2009).

L'examen d'imagerie médicale qu'est la TEP au FDG est également utilisée pour évaluer l'efficacité de traitements visant à réduire la progression de la MA (Reiman, 2011).



**Figure 13 :** Images TEP cliniques de la fixation du [<sup>18</sup>F]FDG chez un témoin âgés et un patient Alzheimer. On note un hypométabolisme cortical important chez les patients atteints de MA (d'après Koeppe, et al., 2005).

Chacun des biomarqueurs cités ci-dessus a montré son efficacité dans le diagnostic de la MA. Les marqueurs physiopathologiques sont bien corrélés avec leurs lésions neuropathologiques respectives, dosage de Aβ42 dans le LCR et PET au [<sup>11</sup>C]PIB pour les plaques amyloïdes, et dosage de t-tau et p-tau dans le LCR pour les DNF. Quant aux marqueurs topographiques, ils permettent de prédire le développement d'une MA dans une cohorte de patient MCI et sont corrélés à la sévérité de la MA (pour revue Bohnen, et al., 2012 ; Dubois, et al., 2010 ; Nordberg, et al., 2010). Cependant, ils montrent chacun des faiblesses, notamment en terme de spécificité, et c'est pourquoi ils sont intégrés dans les nouveaux critères diagnostiques en tant que critères secondaires. Aujourd'hui, c'est la combinaison de ces biomarqueurs qui semble montrer la meilleure efficacité dans la prédiction du déclin cognitif (Shaffer, et al., 2013). Bien évidemment des efforts sont toujours en cours dans le domaine des biomarqueurs de la MA avec, par exemple, le dosage sanguin des protéines actuellement dosées dans le LCR. En effet, la ponction lombaire est un examen invasif pour le patient et il serait intéressant de le remplacer

par une simple prise de sang. Des études sont en cours pour évaluer la faisabilité et la fiabilité d'un dosage sanguin d'Aβ42 (Mayeux et Schupf, 2011). Mais jusqu'à présent, les études réalisées sur le dosage d' Aβ dans le plasma montrent des résultats contradictoires, probablement en raison de l'origine périphérique de l'Aβ plasmatique qui ne refléterait pas le renouvellement cérébral. De plus, la nature hydrophobique d' Aβ induit une forte liaison aux protéines plasmatiques qui peut être une source d'interférences analytiques (pour revue Blennow, et al., 2010).

### ***c) Diagnostic différentiel***

Le diagnostic différentiel se pose surtout en début d'évolution de la maladie, soit avec des troubles non démentiels, soit avec d'autres démences. Ce diagnostic différentiel est d'autant plus important que l'utilisation des médicaments de la MA dans d'autres affections sans déficit cholinergique peut conduire à des effets indésirables importants. Les affections non démentielles qui peuvent interférer avec le diagnostic de la MA sont : les troubles bénins de la mémoire liés au vieillissement, les troubles cognitif légers, les épisodes dépressifs majeurs, le syndrome confusionnel ou le retard mental. Cependant, ce diagnostic différentiel intervient aussi avec d'autres démences qui peuvent être de plusieurs origines : infectieuse (syphilis, démence associées au VIH, maladie de lyme), neurochirurgicale (tumeurs bénignes d'évolution lente, hématome sous-durale), dysmétabolique (adrénoleucodystrophie). Mais ce sont les autres démences neurodégénératives qui posent le plus de problèmes avec notamment la démence à corps de Lewy (DCL) et la démence frontotemporale (DFT).

La DCL est une démence liée au métabolisme d'une protéine : l'α-synucléine. Elle fait partie d'un ensemble de maladies que l'on regroupe sous le terme de synucléopathies. Dans la DCL, les troubles mnésiques ne sont pas forcément au premier plan au début, mais ils deviennent manifestes avec l'évolution de la maladie. Cette démence associe trois signes évocateurs : 1) des fluctuations importantes de l'état cognitif au niveau attentionnel, avec des variations d'un jour à l'autre ou d'une semaine à l'autre. 2) Des hallucinations principalement visuelles, elles sont durables et récidivantes. Le patient les critique peu et les décrit facilement. 3) un syndrome parkinsonien akinétohypertonique spontané avec une instabilité posturale. Celui-ci peut être

accompagné d'un tremblement de repos. La présence d'au moins deux de ces signes en plus de la démence fait poser le diagnostic de DCL.

La DFT constitue un groupe hétérogène sur le plan neuropathologique et génétique. Le tableau clinique associe des troubles du comportement, des modifications de l'affectivité et des altérations cognitives dominées par des troubles du langage. Le terrain est particulier car la DFT intéresse des sujets en général plus jeunes que dans le cas de la MA et il y a souvent une histoire familiale de la maladie. L'IRM cérébrale permet en général de différencier la DFT de la MA en montrant une atrophie corticale marquée au niveau frontal. Cependant il existe une forme de DFT dite temporale où l'atrophie touche longtemps de façon élective les régions temporales. Un examen neuropsychologique approfondi, associé aux critères diagnostiques de la MA permet de différencier ces deux démences.

## **5. Traitements**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif de la MA. Les médicaments disponibles sur le marché et approuvés par les agences de sécurité sanitaire, la « Food and Drug Administration » aux Etats Unis (FDA), l'« European Agency for the Evaluation of Medicinal Products » pour l'Europe (EMA) et « l'Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé » en France (ANSM), ne permettent qu'un ralentissement de la progression de la maladie. Certains traitements adjuvants sont régulièrement utilisés, tels que les anti-inflammatoires, les antioxydants et certaines molécules à visée psycho-comportementale.

### ***a) Schéma thérapeutique actuel***

En France, seules quatre molécules ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) avec comme indication le traitement de la MA. Il s'agit de trois inhibiteurs de l'Acétylcholine estérase (I-AChE) et d'un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate (N-méthyl-D-aspartate).

L'ACh est un neurotransmetteur majeur du SNC, et il est établi depuis longtemps que la transmission cholinergique est diminuée au cours de la MA (pour revue Wollen, 2010). De plus, il y a une perte sélective des neurones cholinergiques au niveau de l'hippocampe, du cortex frontal et du noyau basal de Meynert (pour revue Sun, et al.,



2012). Enfin, la dépression du système cholinergique central est corrélée au déficit mnésique de la MA (Mufson, et al., 2008). L'ensemble de ces données a apporté les bases scientifiques à l'élaboration des molécules visant à restaurer la concentration d'ACh. Ces molécules sont les I-AChE qui est l'enzyme de dégradation de l'ACh, il s'agit du donépézil (Aricept®), de la rivastigmine (Exelon®) et de la galantamine (Reminyl®). Une première molécule, la tacrine, a été retirée du marché en 2004 à cause de sa toxicité hépatique. Les caractéristiques pharmacodynamiques des I-AChE sont résumées dans le tableau 2. Il a été rapporté que le niveau cortical d'acétylcholine transférase (AChT), l'enzyme de synthèse de l'ACh, est diminué dans les stades avancés de MA. A contrario, le niveau d'AChT hippocampique est augmenté chez les patients MCI et dans les MA prodromales (DeKosky, et al., 2002). Ceci laisse penser à un mécanisme compensatoire qui maintiendrait un état cognitif normal en début de maladie, et suggère que le traitement par I-AChE devrait être initié le plus tôt possible après le diagnostic de MA (Mufson, et al., 2008).

Un autre système de neurotransmission est aussi atteint dans la MA, il s'agit du glutamate. Ce dernier est le neurotransmetteur exciteur le plus fréquent du SNC et est impliqué dans de nombreux processus cognitifs, notamment la mémoire et l'apprentissage (Francis, 2008). Lorsque le réseau glutamatergique cortico-cortical est lésé, cela implique des troubles de ces processus (Myhrer, 2000). De plus, il a été rapporté une perte de neurones glutamatergiques pyramidaux au cours de la MA (Francis, et al., 1993b). La baisse du tonus glutamatergique rapporté dans la MA est compensé par un mécanisme de « up-regulation » qui augmente le « bruit de fond » de la neurotransmission (Francis, 2008). L'implication des récepteurs NMDA dans ce mécanisme conduit au phénomène d'excitotoxicité qui aggrave la perte neuronale de la MA. La mémantine (Ebixa®), un antagonistes des récepteurs au glutamate NMDA (tableau 2), est utilisée dans le but de réduire l'excitotoxicité provoquée par l'hyperstimulation de ces récepteurs. Bien que la FDA ait approuvé l'utilisation de la mémantine uniquement dans les cas sévères de MA, des études ont montré son efficacité dans les stades légers et modérés de la maladie (Bakchine et Loft, 2008 ; Winblad, et al., 2007 ; Wollen, 2010).

En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) donne les recommandations suivantes concernant l'utilisation de ces molécules :

- au stade léger (MMSE > 20) : un inhibiteur de la cholinestérase (donépézil, galantamine ou rivastigmine).
- au stade modéré (10 < MMSE < 20) : un inhibiteur de la cholinestérase ou un antiglutamate (mémantine).
- au stade sévère (MMSE < 10) : un antiglutamate.

Toujours selon la HAS, une bithérapie (inhibiteur de cholinestérase et mémantine) a été comparée à une monothérapie par inhibiteur de cholinestérase, mais en l'état actuel des données, il n'y a pas d'argument pour recommander une bithérapie.

Characteristic	Donepezil	Rivastigmine	Galantamine	Memantine
Time to maximal serum concentration (hr)	3–5	0.5–2	0.5–1	3–7
Absorption affected by food	No	Yes	Yes	No
Serum half-life (hr)	70–80	2†	5–7	60–80
Protein binding (%)	96	40	0–20	45
Metabolism	CYP2D6, CYP3A4	Nonhepatic	CYP2D6, CYP3A4	Nonhepatic
Dose (initial/maximal)	5 mg daily/ 10 mg daily	1.5 mg twice daily/ 6 mg twice daily	4 mg twice daily/ 12 mg twice daily	5 mg daily/ 10 mg twice daily
Mechanism of action	Cholinesterase inhibitor	Cholinesterase inhibitor	Cholinesterase inhibitor	NMDA-receptor antagonist

**Tableau 2 :** Principales caractéristiques pharmacocinétiques et posologies des médicaments de la MA. CYP2D6 et CYP3A4 : isoformes 2D6 et 3A4 des enzymes de métabolisation hépatique cytochrome P450. † indique que la rivastigmine a une demi-vie d'inhibition de l'AcChE de 8 heures dans le cerveau (d'après Cummings, 2004).

Les recommandations de la HAS ont été réactualisées fin 2011 (avec un Service Médical Rendu considéré dorénavant comme faible). De plus, la HAS recommande la mise en place de conditions de prescription plus strictes des traitements de la maladie anti-Alzheimer, avec une réévaluation complète et systématique au bout de six mois de traitement, puis tous les ans. La poursuite éventuelle du traitement est décidée en concertation entre le médecin généraliste traitant, le gériatre, le neurologue ou psychiatre, le réseau de soins, ainsi que le patient lui-même si possible et son aidant.

Un autre élément clef dans la prise en charge des patients Alzheimer est le traitement des troubles BPSD avec une attention particulière portée sur la dépression et les

troubles psychotiques. En effet, en 2007 la HAS constate que 30 à 40 % des patients traités pour une MA ont aussi un traitement antidépresseur. Le plus souvent il s'agit d'un inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine (ISRS) ou un inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNA). Cependant les résultats des études sont contradictoires quant à l'efficacité réelle de telles prescriptions sur les troubles cognitifs des patients (Cummings, 2004 ; Sepehry, et al., 2012). Les antipsychotiques peuvent aussi être utilisés dans le cadre de la prise en charge des patients Alzheimer qui présentent des symptômes psychotiques ou des agitations. Les antipsychotiques atypiques (risperidone, olanzapine) sont mieux tolérés car ils produisent moins d'effets secondaires (syndromes extrapyramidaux, dyskinésies tardives) que les neuroleptiques classiques. Cependant certaines études suggèrent que les antipsychotiques pourraient accélérer la progression de la maladie (pour revue Wollen, 2010).

Actuellement, en plus des traitements spécifiques de la MA, les cliniciens peuvent utiliser d'autres molécules comme les antioxydants (association de vitamine E et sélégiline) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ces derniers sont très étudiés ces dernières années car ils pourraient représenter un facteur protecteur contre la MA (pour revue Etminan, et al., 2003 ; Szekely, et al., 2004). Pour finir, la prescription de médicaments n'est qu'un aspect de la prise en charge des patients. Ceux-ci doivent bénéficier, au sein de structures adaptées, d'une prise en charge globale comprenant des entraînements cognitifs, de l'ergothérapie, un soutien à l'activité physique et bien sûr un accompagnement social et familial surtout.

### ***b) La recherche thérapeutique***

La connaissance plus fine des différents processus aboutissant au tableau clinique de MA a permis l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques. Une des pistes actuellement à l'étude est le complexe enzymatique des sécrétases qui génèrent la production des peptides amyloïdes. Un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase a été testé en phase II chez l'homme, mais les résultats sur le plan cognitif se sont avérés négatifs (Fleisher, et al., 2008). Cependant plusieurs équipes ont rapporté que des inhibiteurs de  $\beta$ -sécrétase réduisent la production de peptide A $\beta$  chez des modèles animaux (Chang, et al., 2004 ;

Hussain, et al., 2007). Une autre piste particulièrement étudiée de nos jours concerne la protéine tau. En effet, les différentes étapes du processus physiopathologique de la taupathie sont autant de cibles potentielles en cours d'investigation. Une de ces approches consiste à empêcher l'agrégation de tau en oligomères puis en fibrilles. En effet, il semble possible d'interrompre la polymérisation de tau (pour revue Brunden, et al., 2009). Une équipe a conduit un essai de phase II avec un inhibiteur d'agrégation de tau qui semble efficace cliniquement dans la réduction du déclin cognitif (Wischik et Staff, 2009). D'autres stratégies concernant la protéine tau sont à l'étude. Il s'agit d'une part de stabiliser les microtubules qui sont désorganisées par les agrégats de protéines tau, ou de cibler les kinases et phosphatases impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau (pour revue Gotz, et al., 2012). Enfin une stratégie qui porte beaucoup d'espoir vise à immuniser les patients contre les plaques amyloïdes par injection des peptides A $\beta$ 42 synthétiques. Le rationnel fondamental de cette technique a été initié par l'équipe de Schenk en 1999 sur une souche de souris transgéniques. Cette souche, mutante sur le gène APP, développe spontanément des plaques contenant le peptide A $\beta$  en trois à six mois. L'immunisation, par injection de peptide synthétique A $\beta$  chez ces souris jeunes de six semaines, réduit la formation des plaques contenant le peptide A $\beta$  ainsi que les changements neuropathologiques type Alzheimer qui en découlent (Schenk, et al., 1999). D'autres études réalisées sur des modèles animaux de MA ont confirmé ces résultats (Janus, et al., 2000 ; Morgan, et al., 2000). Sur la base de ces résultats précliniques, un essai international multicentrique de phase II a été réalisé sur un total de 375 patients Alzheimer (Orgogozo, et al., 2003). Cette étude a montré que les patients immunisés ont produit des anticorps traversant la barrière hémato-encéphalique et réduisant la charge de dépôts amyloïdes. De plus, ces résultats étaient concordants avec une moindre progression du déficit cognitif chez ces patients (Hock, et al., 2003). Malheureusement, cet essai a dû être interrompu car 6 % des patients « vaccinés » ont développé une méningo-encéphalite. Cependant, cette étude a tout de même encouragé le développement d'autres anticorps anti-A $\beta$  humanisés, ou de fragments d'anticorps, qui sont aujourd'hui à l'essai (pour revue Madeo et Frieri, 2013). Une démarche similaire a été appliquée ces dernières années à la protéine tau. Des essais d'immunisation active par injection de peptides contenant les épitopes de phosphorylation de tau sont en cours sur des modèles animaux. De plus, l'immunisation passive par injection d'anticorps dirigés contre certains sites de phosphorylation bien

précis est aussi testée chez des modèles de souris (pour revue Gotz, et al., 2012). Ainsi, l'ensemble de ces résultats, cliniques ou précliniques, laisse espérer la mise au point de traitements immunologiques de la MA dans les prochaines années.

Pour conclure ce chapitre sur la MA, il ressort, notamment depuis la mise à jour des critères diagnostiques entamée en 2007, l'importance majeure des biomarqueurs. En effet, ceux-ci, qu'ils soient biochimiques ou d'imagerie, permettent un diagnostic de plus en plus précoce et précis. Concernant l'atteinte des systèmes de neurotransmission, relativement peu de données existent concernant les mécanismes de ces atteintes et l'évolution de ces systèmes au cours de la MA, si ce n'est aux stades évolués et terminaux de la maladie. Ainsi, de nombreux efforts sont dirigés vers la recherche de nouveaux biomarqueurs permettant de comprendre l'atteinte des systèmes de neurotransmission. Le chapitre suivant est consacré à l'atteinte du système sérotoninergique dans la MA.

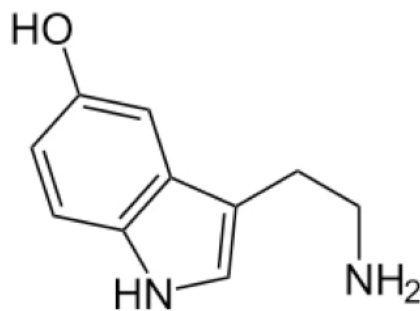
## **B. La neurotransmission sérotoninergique dans la MA**

### **1. La neurotransmission sérotoninergique**

#### ***a) La sérotonine***

En 1946, l'italien Vittorio Erspamer mit en évidence une substance vasoconstrictrice qui, étant issue du sérum et ayant une activité tonique sur les vaisseaux, fut appelée sérotonine (Erspamer, 1946). Plus tard, certains auteurs découvrirent que cette sérotonine correspondait chimiquement à un autre facteur découvert quelques années auparavant : l'entéramine. Celle-ci, produite par les cellules entérochromaffines de l'intestin, a été mise en évidence grâce à sa capacité stimulatrice du péristaltisme intestinal (Dalglish, et al., 1953). Ces deux molécules ne sont donc qu'une seule entité chimique, la 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Figure 14). La 5-HT est une amine biogène présente chez une grande variété d'organismes vivants du règne animal (des ascidies jusqu'aux mammifères) et du règne végétal (Ishihara, et al., 2008). Chez l'homme, plus de 80 % de la 5-HT est produite au niveau périphérique par les cellules entérochromaffines de la paroi intestinale. Elle est ensuite stockée dans les plaquettes sanguines où elle a un rôle dans la contraction des cellules musculaires lisses. Nous savons que la 5-HT ne passe pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce sont les

neurones des noyaux du raphé qui la produisent au niveau du SNC où elle est largement répandue et agit comme neurotransmetteur produisant ses effets via un grand nombre de récepteurs spécifiques. Au travers de ses récepteurs, la 5-HT est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques : la thermorégulation, la régulation du cycle veille-sommeil, la régulation cardiovasculaire, le comportement sexuel, le comportement alimentaire, le contrôle de la douleur, le contrôle émotionnel, certains processus cognitifs comme la mémoire et l'apprentissage, et enfin la morphogénèse cérébrale. Ainsi, les dysfonctions du système sérotoninergique sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques tels que le syndrome de mort subite du nourrisson, l'autisme, les céphalées, certains troubles de l'humeur ou du comportement comme l'anxiété et la dépression (Altieri, et al., 2013) ou l'anorexie, les maladies neurodéveloppementales comme la schizophrénie ou les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la MA (pour revue Charnay et Leger, 2010). L'implication de la 5-HT dans la MA sera développée ultérieurement.



**Figure 14 :** Structure de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) ou sérotonine.

Dans le SNC, une sous population neuronale possède les enzymes nécessaires à la synthèse de la 5-HT. Celle-ci comporte deux étapes à partir du précurseur de la 5-HT, le tryptophane. Cet aa essentiel est apporté par la nourriture et co-transporté activement à travers la BHE avec d'autres aa. La quantité de 5-HT cérébrale dépend donc, en partie, de facteurs qui influencent la quantité plasmatique de tryptophane libre capable de traverser la BHE (Silber et Schmitt, 2010). La première étape de la synthèse de la 5-HT est catalysée par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPOH), l'hydroxylation du tryptophane par la TPOH est l'étape limitante de la synthèse de 5-HT. Des études d'inactivation du gène de cette enzyme chez des souris ont montré qu'il existe deux isoformes TPOH1 et TPOH2, l'isoforme TPOH2 étant exprimée par les neurones sérotoninergiques des noyaux du Raphé (Matthes, et al., 2010). Des études montrent que

certaines troubles neuropsychiatriques liés à la 5-HT pourraient être corrélés à des variants génétiques de la TPOH2 (Zhang, et al., 2006). Le 5-hydroxytryptophane formé par TPOH1/TPOH2 est ensuite transformé en 5-HT par l'action de la L-amino acide décarboxylase (AADC) qui n'est pas spécifique de la 5-HT puisqu'elle est aussi retrouvée dans les neurones catécholaminergiques.

Dans le SNC, la 5-HT est métabolisée par une enzyme associée à la membrane mitochondriale, la monoamine oxydase de type A (MAO-A). Cette enzyme catalyse la désamination de la 5-HT pour former le 5-hydroxyindole acétaldéhyde (5-HIAA). Ce métabolite se retrouve dans le LCR et les urines à des doses détectables analytiquement. La demi-vie de la 5-HT est estimée à quelques minutes, c'est pourquoi les échanges de 5-HT entre le SNC et les autres tissus semblent très réduits malgré l'observation d'efflux de 5-HT à travers la BHE chez le rat (Nakatani, et al., 2008).

Un des éléments majeurs du métabolisme de la 5-HT est le transporteur spécifique de la 5-HT (SERT ou 5-HTT). Le rôle physiologique principal de SERT est la clairance de la 5-HT au niveau de l'espace extracellulaire, et de ce fait, il contrôle l'amplitude et la durée de la transmission sérotoninergique (Mochizuki, et al., 2005). Le SERT est retrouvé au niveau central mais aussi au niveau périphérique sur les plaquettes et les cellules entérochromaffines notamment. Comme pour les autres monoamines, la recapture de la 5-HT par le SERT est un mécanisme actif ATP-dépendant. Un ensemble de protéines associées au SERT (phosphatases et phosphokinases entre autres) régulent la cinétique du transport. Après la recapture neuronale par le SERT, la 5-HT peut être dégradée par la MAO-A ou stockée dans des vésicules par un transporteur H<sup>+</sup>-dépendant spécifique des monoamines : le « vesicular monoamine transporter 2 » (VMAT2). Une fois transférée dans ces vésicules de stockages, la 5-HT peut être à nouveau relarguée dans la fente synaptique pour transmettre l'influx nerveux (pour revue Charnay et Leger, 2010).

## ***b) Anatomie du réseau sérotoninergique cérébral***

### ***i. Les corps cellulaires***

La distribution régionale des neurones sérotoninergiques a été étudiée initialement par Dählström et Fuxe dans les années soixante. Par une technique d'histofluorescence, ils ont été les premiers à observer les corps cellulaires (appelés somas) des neurones à 5-

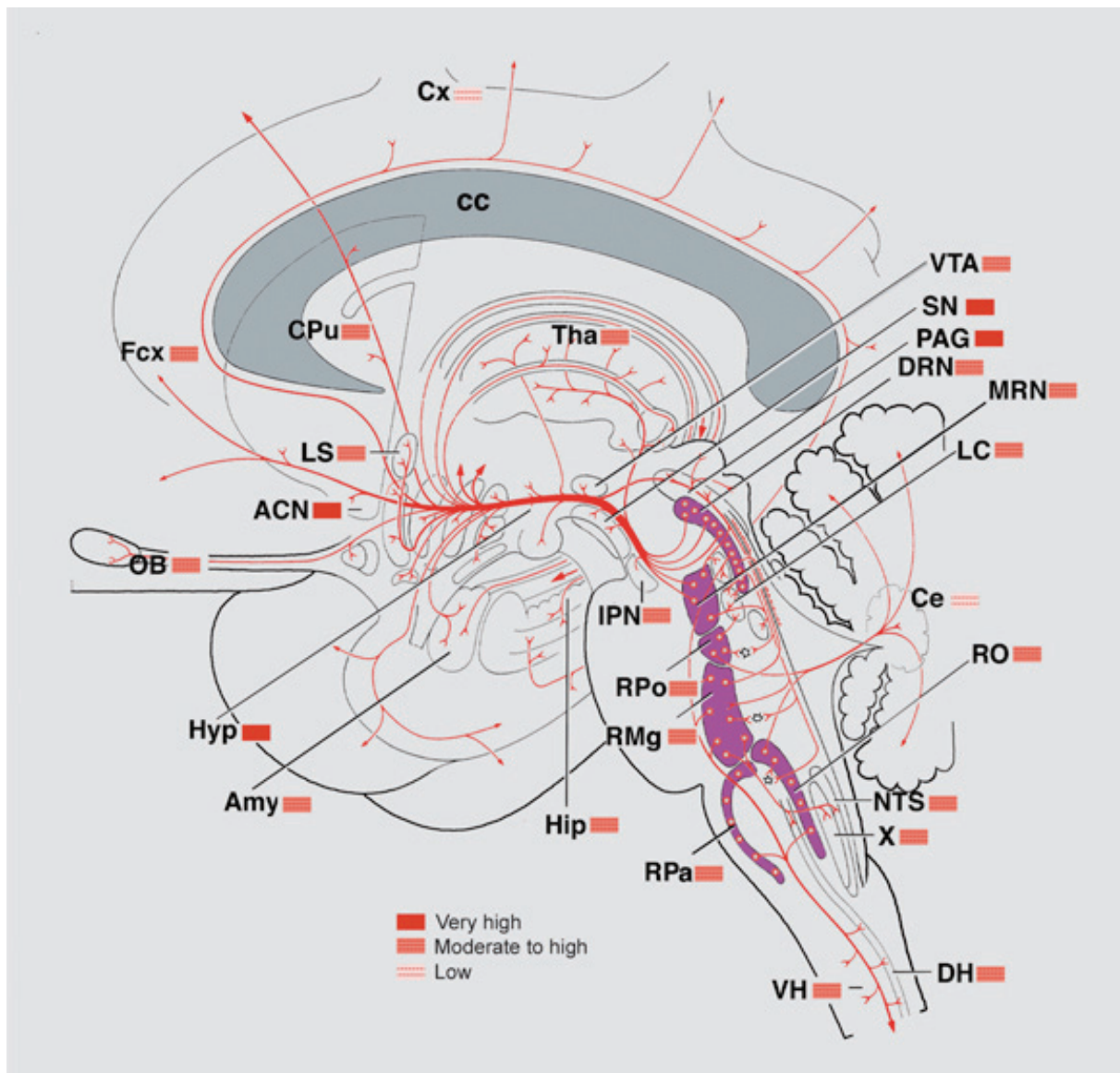
HT (Dahlstrom et Fuxe, 1964). Chez l'homme, ces neurones représentent un ensemble d'environ 350 000 cellules dont la localisation des somas est cantonnée au tronc cérébral. Les corps cellulaires des neurones à 5-HT, regroupés en neuf noyaux appelés B1 à B9, sont majoritairement présents dans la partie médiane des noyaux du raphé (allant de la *medulla oblongata* à la partie médiane du mesencéphale) et dans la formation réticulée (figure 15). Les groupes B1 à B5, qui contiennent un nombre moins important de corps cellulaires que les autres groupes, sont situés au niveau caudale entre la partie rostrale du pons et la medulla oblongata. Les groupes B6 et B7, les plus importants en nombre de corps cellulaires, forment le noyau du raphé Dorsal (NRD). Le groupe B8 représente le noyau du raphé median (NRM) et le groupe B9 forme son extension latérale mais ne fait pas partie du NRM. Il a été rapporté que le NRD contient à lui seul 50 % des neurones 5-HT du SNC du rat (Descarries, et al., 1982) et 50 à 60 % chez l'homme (Baker, et al., 1990). Il a été prouvé récemment que les neurones 5-HT du NRD ne forment pas une classe cellulaire homogène. Au contraire, ils montrent des caractéristiques anatomiques et des propriétés électrophysiologiques hétérogènes qui permettent de distinguer au moins deux classes cellulaires distinctes (pour revue Andrade et Haj-Dahmane, 2013).

## ii. Les projections

Les somas sérotoninergiques précédemment décrits innervent l'ensemble du SNC par des projections efférentes qui peuvent être séparées en 2 groupes. Les projections ascendantes qui innervent les structures cérébrales supérieures (cortex, thalamus, hypothalamus, etc) et les projections descendantes qui vont vers le tronc cérébral et la moelle épinière (Figure 15). Les corps cellulaires qui projettent les voies descendantes font partie des groupes situés caudalement et représentent environ 15% de la population neuronale sérotoninergique. Les voies ascendantes, issues des 85% de neurones 5-HT constituant les groupes situés au niveau rostral, vont innerver l'ensemble du SNC (Hornung, 2003). Les fibres originaires du NRM innervent fortement l'hippocampe, le septum, l'hypothalamus, l'amygdale et les cortex cingulaire et occipital. Quant au NRD, il projette sur le locus coeruleus, le locus niger, le thalamus et l'hypothalamus, le striatum, l'amygdale, l'hippocampe, les cortex entorhinal et frontal (Pineyro et Blier, 1999). Enfin, il existe des projections sérotoninergiques aux seins même des noyaux du raphé, le NRD projetant sur le NRM, la formation réticulée



recevant des axones 5-HT sur les noyaux moteur des nerfs crâniens (pour revue Hensler, 2006).



**Figure 15 :** Schéma d'une coupe sagittale de cerveau humain représentant la distribution du système sérotoninergique. Les noyaux du raphé apparaissent en violet et les axones issus des somas sérotoninergiques sont représentés en rouge. Seules les aires terminales principales sont représentées et la densité du réseau axonale sérotoninergique, dans ces aires principales, est indiquée dans la légende (d'après Charnay et Leger, 2010). X, dorsal motor n of the vagus nerve; ACN, accumbens n; Amy, amygdala; cc, corpus callosum; Ce, cerebellum; CPu, caudate-putamen; Cx, cortex; DH, dorsal horn spinal cord; DRN, dorsal raphe n; Fcx, frontal cortex; Hip, hippocampus; Hyp, hypothalamus; IPN, interpeduncular n; LC, locus coeruleus; LS, lateral septum; MRN, median raphe n; n, noyaux; NTS, n of the solitary tract; OB, olfactory bulb; PAG, periaqueductal gray; RMg, raphe magnus n; RO, raphe obscurus n; Rpa, raphe pallidus; RPo, raphe pontis n; SN, substantia nigra; Tha, thalamus; VH, ventral horn; VTA, ventral tegmental area.

Il est important de noter que les voies 5-HT ascendantes ont des axones de deux types morphologiques différents. Le NRD envoie des axones portant de petites varicosités espacées et allongées qui ne sont pas impliqués dans les jonctions synaptiques. Le NRM projette des axones 5-HT épais avec des varicosités rondes et rapprochées les unes des autres. Dans l'hippocampe, notamment la région CA3 et le gyrus denté, la proportion des varicosités sérotoninergiques associées à des jonctions synaptiques n'est que de 18 à 33% (Oleskevich, et al., 1991). De la même manière, il a été montré dans le cortex de rat que la majorité des varicosités n'est pas associée à une spécialisation synaptique (Descarries et Mechawar, 2000). Ainsi, l'innervation du cortex et de l'hippocampe serait principalement non-jonctionnelle. L'ensemble de ces constatations, associé à la large distribution des terminaisons 5-HT donnent au système sérotoninergique une grande capacité d'interaction avec les autres systèmes de neurotransmission et confirment ainsi son rôle de neuromodulateur majeur du SNC.

### ***c) Les récepteurs sérotoninergiques***

Dès les années 50, plusieurs types de récepteurs à la 5-HT ont été référencés. La première classification fut réalisée sur des critères fonctionnels : inhibition de l'action de la 5-HT sur l'iléum de cobaye par la morphine pour le premier groupe (groupe M), et par la dibenzylamine pour le deuxième groupe (groupe D) (Gaddum et Picarelli, 1957). A la fin des années 70, plusieurs sites de liaison ont été identifiés grâce à différents ligands, le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD) et la spiperone notamment, que seule la 5-HT peut déplacer (Peroutka et Snyder, 1979). A partir de 1987, l'étude des récepteurs à la 5-HT connaît un nouvel essor grâce aux techniques de biologie moléculaire que sont le clonage et le séquençage. Dès lors, le nombre de récepteurs à la 5-HT a considérablement augmenté et, aujourd'hui, l'International Union of basic and clinical Pharmacology (IUPHAR) reconnaît 17 types différents de récepteurs sérotoninergiques, regroupés en sept classes distinctes (5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>) selon leur homologie de séquence et de structure, ainsi que selon leur mécanisme effecteur préférentiel (pour revue Hoyer, et al., 1994 ; Hoyer, et al., 2002 ; Millan, et al., 2008). A l'exception des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> qui sont des canaux ioniques (ionotropes), tous les récepteurs à la 5-HT font partie de la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).

Les récepteurs ionotropes 5-HT<sub>3</sub>, au nombre de trois (5-HT<sub>3A</sub>, 3B, 3C), font partie de la super-famille des « ligand-gated ions chanel », et sont issus de l'assemblage de plusieurs sous-unités en pentamères. Ces récepteurs déclenchent une dépolarisation membranaire provoquée par l'afflux intracellulaire massif de cations (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>). Ce courant ionique transitoire résulte de l'ouverture du canal ionique suite à la fixation de la 5-HT sur le récepteur (pour revue Holbrook, et al., 2009).

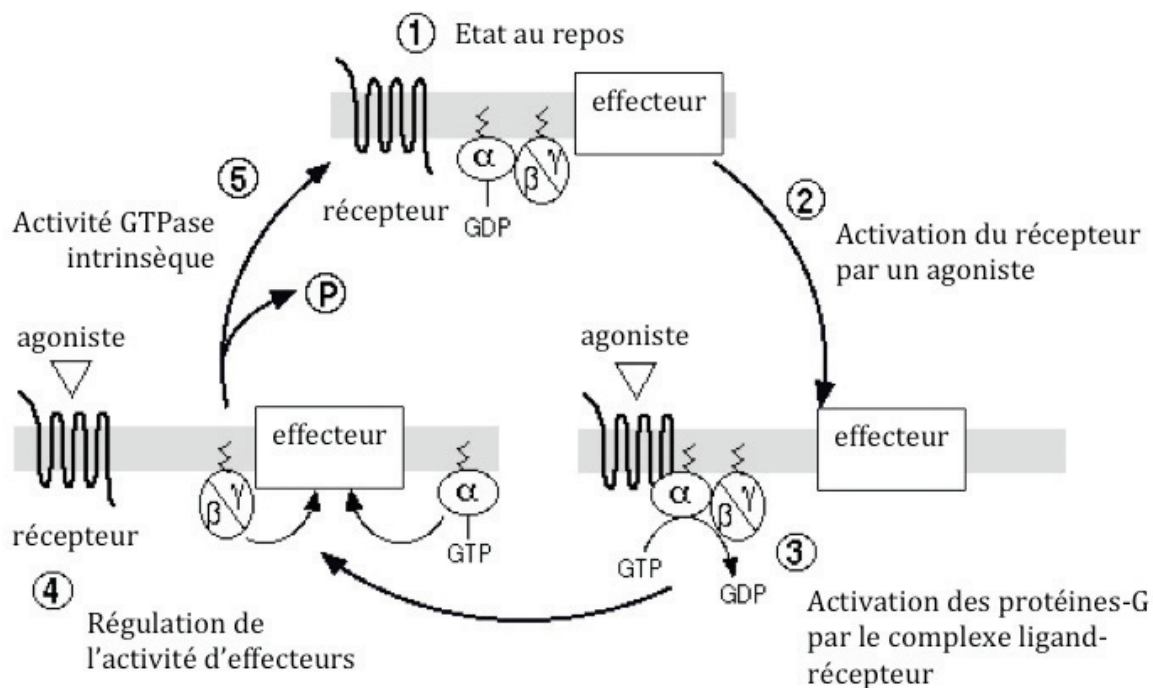
La famille des RCPGs révèle une homogénéité de structure qui est faite de sept hélices alpha transmembranaires avec trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. L'extrémité carboxy-terminale se trouve du côté intracellulaire et l'extrémité amino-terminale dans le milieu extracellulaire. La 5-HT, en tant que ligand endogène agoniste, va se fixer sur l'un de ces nombreux RCPGs. Ceux-ci sont couplés, dans leur partie C-terminale, à un complexe protéique formé de trois sous unités hétérogènes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). La sous-unité  $\alpha$  a, seule, la capacité de lier le GTP (pour guanosine triphosphate) ou le GDP (pour guanosine diphosphate) selon l'état d'activation du récepteur. C'est ce complexe trimérique qui constitue la protéine G. Lorsqu'un agoniste se fixe au récepteur dans sa partie extracellulaire, il s'en suit un changement de conformation qui permet l'échange du GDP par un GTP cytosolique. La sous unité  $\alpha$  ainsi activée provoque la dissociation des sous unités  $\beta\gamma$ , qui restent accrochées au récepteur, et  $\alpha$ -GTP qui vont aller activer la cascade d'effecteurs intracellulaires. Le cycle de transduction du signal se termine lorsqu'une GTPase hydrolyse le complexe  $\alpha$ -GTP en  $\alpha$ -GDP, ce dernier étant à nouveau disponible pour former un complexe avec les sous unités  $\beta\gamma$  et ainsi être couplé à un récepteur libre (Figure 16).

Les récepteurs sérotoninergiques métabotropes appartenant à une classe donnée sont couplés majoritairement à un type de protéine G (Tableau 3), mais ce couplage n'est pas exclusif et d'autres types de protéines G et d'effecteurs intracellulaires peuvent intervenir pour une même classe de récepteurs (Mannoury la Cour, et al., 2006). Les protéines G<sub>i/o</sub> couplent les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> (A, B, D, E et F) dans leur majorité ainsi que les récepteurs 5-HT<sub>5</sub>. L'activation des protéines G<sub>i/o</sub> inhibitrices, consécutive à l'activation de ces deux classes de récepteurs, entraîne l'inhibition de l'enzyme adénylate cyclase et la baisse de la concentration intracellulaire de son produit de réaction, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (A, B et C) sont préférentiellement couplés aux protéines G<sub>q/11</sub> qui activent la phospholipase C

(PLC). Celle-ci provoque l'augmentation de la concentration intracellulaire en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Ces messagers secondaires vont permettre la transmission du message qui aboutira à l'augmentation du calcium intracellulaire. Enfin les protéines  $G_s$  couplent les récepteurs des classes 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub>. L'activation de ces protéines  $G_s$  induit la stimulation de l'adénylate cyclase qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. Ce messager secondaire intracellulaire va agir sur différentes cibles effectrices, notamment les canaux ioniques et la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). L'ensemble de cette cascade intracellulaire permet, entre autres, l'entrée d'ions calcium dans la cellule et facilite l'excitabilité de la membrane (pour revue Millan, et al., 2008).

Récepteurs		Distribution	Couplage principal	Signal principal
5-HT 1	1A	SNC	G i/o	AC (-) : diminution AMPc
	1B	SNC	G i/o	
	1D	SNC	G i/o	
	1E - F	SNC + périphérique	G i/o	
5-HT 2	2A	SNC, muscle	G q/11	PLC (+) : augmentation IP3
	2B	Fundus	G q/11	
	2C	SNC	G q/11	
5-HT 4		SNC, muscle lisse	G s	AC (+) : augmentation AMPc
5-HT 5	A	SNC	G i/o	AC (-) : diminution AMPc
	B	SNC	G i/o	
5-HT 6		SNC	G s	AC (+) : augmentation AMPc
5-HT 7		SNC	G s	AC (+) : augmentation AMPc

**Tableau 3 :** Les récepteurs sérotoninergiques métabotropes et leurs couplages (d'après Hoyer, et al., 2002 ; Millan, et al., 2008).



**Figure 16 :** Représentation schématique de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par un ligand agoniste (d'après le site internet [rcpg.chez.com](http://rcpg.chez.com)).

## 2. Le système sérotoninergique dans la MA

Dans un chapitre précédant consacré aux lésions caractéristiques de la MA, nous avons vu que celles-ci comprenaient les plaques séniles, les dégénérescences neurofibrillaires et une perte neuronale importante et progressive. Parallèlement à l'évolution de ces lésions, plusieurs systèmes de neurotransmission sont affectés par la maladie (Lyness, et al., 2003). Bien que le système cholinergique semble atteint en priorité, et qu'il soit la cible des principaux traitements pharmacologiques actuellement disponibles, les troubles cognitifs et les symptômes comportementaux (regroupés sous le terme BPSD) associés à la MA ont été imputés à d'autres systèmes de neurotransmission (Assal et Cummings, 2002).

Ainsi, le système sérotoninergique apparaît fortement affecté lui aussi par la MA. En effet, il a été démontré, par immunohistochimie *post mortem*, une réduction importante de la densité des corps cellulaires sérotoninergiques dans le NRD (diminution de 41%) et le NRM (diminution de 29%) chez des patients Alzheimer, comparés à des sujets sains (Chen, et al., 2000). De plus, il a été observé, dans les parties rostrale et caudale du NRD, une diminution du marquage immunohistochimique de l'enzyme tryptophane

hydroxylase dans le cerveau de patients décédés après une MA (Lee & Kowall, 1989). Cependant, l'atteinte du système sérotoninergique ne se limite pas aux corps cellulaires des neurones, car dans les aires de projections corticales de patients souffrant de MA à un stade encore léger, le transporteur de la 5-HT est diminué, tout comme la 5-HT elle-même et ses métabolites (Chen, et al., 1996 ; Cross, et al., 1986 ; D'Amato, et al., 1987). Enfin, l'atteinte du système sérotoninergique se révèle aussi au niveau de l'expression des récepteurs à la 5-HT. Ainsi, des études *post mortem* ont montré que les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>6</sub> ont une expression dégradée chez des patients Alzheimer (Lai, et al., 2005 ; Lorke, et al., 2006). En ce qui concerne les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, certaines études montrent que leur expression est diminuée dans la MA (Bowen, et al., 1989 ; Francis, et al., 1993a ; Middlemiss, et al., 1986), mais ces résultats semblent discutés (Cross, et al., 1986 ; Sparks, 1989). Le chapitre suivant s'intéressera plus précisément à l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA.

Ainsi, bien que les corrélations avec les troubles cognitifs ou comportementaux ne soient pas encore clairement établies, le système sérotoninergique semble atteint de façon importante dans la MA (Chen, et al., 2000). La 5-HT est une cible intéressante pour la MA puisque l'utilisation d'antidépresseurs inhibiteurs spécifiques de la recapture de la 5-HT (ISRS) a montré leur efficacité dans la réduction du niveau d'Aβ dans le LCR de souris (Cirrito, et al., 2011). Dans la même étude, les auteurs montrent que des patients âgés, cognitivement normaux mais traités par ISRS, ont une charge amyloïde (quantifiée par TEP au [<sup>11</sup>C]PIB) plus faible que des sujets similaires non traités par ISRS. Ainsi, le système sérotoninergique pourrait être, à l'avenir une cible thérapeutique d'intérêt pour diminuer la charge amyloïde des patients Alzheimer.

## **C. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la maladie d'Alzheimer**

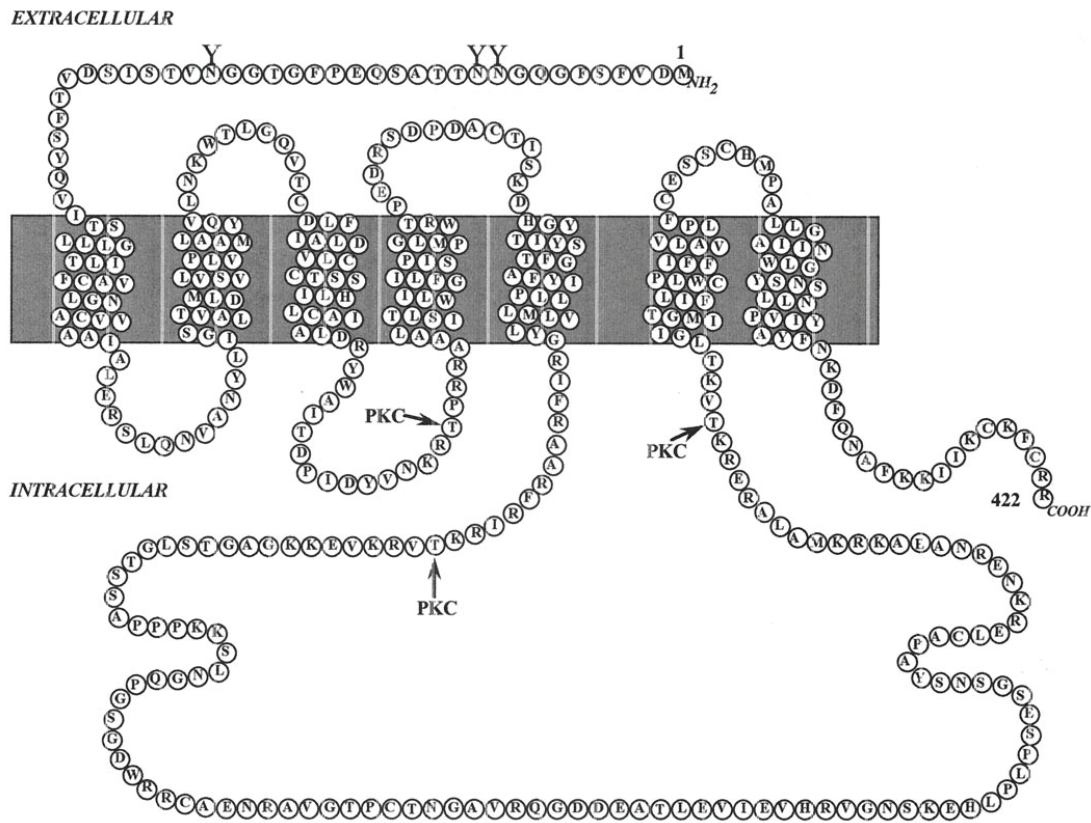
### **1. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>**

De tous les récepteurs à la 5-HT, le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est le plus étudié depuis les premières recherches qui datent des années 80. En effet, grâce à l'utilisation de 5-HT tritiée, les scientifiques mettent en évidence les sites de fixation du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Pedigo, et al., 1981). Puis, la synthèse d'un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, le 8-OH-DPAT (Arvidsson, et al., 1981), et son radiomarquage au tritium ont permis les

premières études de distribution de ce récepteur par autoradiographie (Gozlan, et al., 1983 ; pour revue Hamon, et al., 1990). Par la suite, El Mestikawy réussit la production d'anticorps anti-5-HT<sub>1A</sub> qui furent un outils supplémentaire pour l'étude de ce récepteur (el Mestikawy, et al., 1990 ; Kia, et al., 1996).

## **2. Structure**

Le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> a été le premier des récepteurs à la 5-HT à être entièrement cloné et séquencé (Albert, et al., 1990 ; Fargin, et al., 1988). Il a été montré qu'il possède 50 % d'homologie de séquence avec le récepteur bêta 2-adrénérique, dans sa partie transmembranaire (Kobilka, et al., 1987). Comme nous l'avons dit, le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> fait partie de la super famille des RCPGs, il s'agit donc d'un récepteur à sept domaines transmembranaires (Hoyer, et al., 1994) qui possède des sites de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC) sur les deuxième et troisième boucles intracellulaires (Figure 20). Une des caractéristiques notables de ce récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est le caractère « intronless » du gène codant cette protéine (Albert, et al., 1990). Cette spécificité en fait un modèle très intéressant puisque l'absence d'épissage alternatif fait que la structure primaire de la protéine est toujours la même. Le gène codant pour le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> a été localisé, chez l'homme, sur le chromosome 5 (en 5q11.2-q13). De plus, sa structure est très conservée entre différentes espèces puisque la protéine possède 422 aa chez l'homme et 421 chez le rat et qu'il y a une homologie de 89 % entre les deux séquences.



**Figure 20 :** Structure moléculaire du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (d'après Lanfumey et Hamon, 2000). **PKC** : protéine kinase C.

### 3. Distribution

La distribution régionale des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été établie grâce à la mise au point d'un ligand agoniste spécifique radiomarqué, le [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (Gozlan, et al., 1983 ; Hall, et al., 1985). Par la suite, d'autres études autoradiographiques ont été réalisées avec d'autres radioligands, plus ou moins spécifiques des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Hall, et al., 1997). Ces principaux radioligands sont la [<sup>3</sup>H]5-HT (Pazos et Palacios, 1985), l' [<sup>3</sup>H]ipsapirone (Dompert, et al., 1985), le [125I]p-MPPI (Kung, et al., 1995) et le [<sup>3</sup>H]WAY-100635 (Khawaja, et al., 1995). L'ensemble de ces études, menées sur des coupes histologiques de cerveau de rat, montre une densité importante des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans plusieurs structures distinctes. D'une part dans le système limbique, plus précisément le septum latéral et l'hippocampe, ce dernier possédant une quantité importante dans la partie CA1 de la CA et dans le GD, et dans les cortex entorhinal et frontal et les noyaux du raphé dorsal et médian d'autre part. D'autres structures, certains noyaux thalamiques et hypothalamiques, possèdent une expression significative de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, bien que de moindre importance. Enfin, certaines



régions comme le striatum, la substance noire et le cervelet sont quasiment dépourvues de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (pour revue Lanfumey et Hamon, 2000).

Ces recherches ont été complétées par immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique anti-5-HT<sub>1A</sub> obtenu par immunisation chez le lapin (el Mestikawy, et al., 1990). La distribution autoradiographique des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été confirmée par l'immunohistochimie, qui montre un marquage intense dans les mêmes zones (Lanfumey et Hamon, 2000 ; pour revue Lanfumey et Hamon, 2004).

L'analyse de la distribution de la protéine 5-HT<sub>1A</sub> a été précisée par des études d'hybridation *in situ* avec différentes sondes (marquées au [<sup>32</sup>P]) et spécifiques de la séquence d'ARNm codant la troisième boucle intracellulaire (Pompeiano, et al., 1992). Cette étude met en évidence que l'ARNm du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est localisé dans les mêmes régions que celles qui portent son expression protéique. Ainsi les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ne sont pas transportés loin de leur site de production et sont adressés au compartiment somatodendritique du neurone (pour revue Lanfumey et Hamon, 2000).

La distribution subcellulaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été déterminée par double marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-5-HT<sub>1A</sub> et un autre anticorps anti-5-HT. Au sein du NRD et du NRM, toutes les cellules marquées par l'anti-5-HT<sub>1A</sub> le sont également par l'anti-5-HT (Sotelo, et al., 1990). Ainsi, au niveau du NRD et du NRM, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont localisés sur des neurones sérotoninergiques, on parle d'autorécepteurs. D'autre part, certains auteurs ont montré que la réalisation d'une lésion sérotoninergique, par injection d'une neurotoxine spécifique (5,7 dihydroxytryptamine, DHT), provoque une disparition du marquage autoradiographique au [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT dans le NRD mais aucune variation dans les aires de projections (Verge, et al., 1986). Ce résultat met en évidence que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> situés dans les aires de projections sérotoninergiques sont exprimés par des neurones non-sérotoninergiques, on parle alors d'hétérorécepteurs. Pour finir, des études combinant l'immunohistochimie et la microscopie électronique montrent que dans le NRD, l'immunoréactivité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> est observée uniquement au niveau somatodendritique. Dans l'hippocampe, ce sont les somas et les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA1 ainsi que les cellules granuleuses qui montrent une immunoréactivité aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Riad, et al., 2000 ; Riad, et al., 2001).

#### 4. Propriétés fonctionnelles

La distinction topographique, entre les autorécepteurs des noyaux du raphé et les hétérorécepteurs des structures de projections, a une signification fonctionnelle. En effet, l'activation des autorécepteurs entraîne une diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques et donc de la libération du neurotransmetteur (Sprouse et Aghajanian, 1987). Ainsi, les autorécepteurs provoquent une baisse du tonus sérotoninergique au niveau central. En revanche, l'activation des hétérorécepteurs, situés au niveau post synaptique, réduit l'excitabilité des neurones qui les expriment (Sprouse et Aghajanian, 1988).

Comme nous l'avons vu, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont majoritairement couplés aux protéines G de type G $\alpha_{i/o}$  (pour revue Millan, et al., 2008). La stimulation de ces récepteurs induit une hyperpolarisation membranaire et ainsi, augmente le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action ce qui diminue leur fréquence. C'est pourquoi, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> participent principalement à l'inactivation des neurones qui les expriment. Cependant, il a souvent été observé des différences régionales quant aux caractéristiques pharmacologiques et aux voies de signalisation de ces récepteurs. En effet, des études réalisées sur membranes hippocampiques de rongeurs ont démontré que la 5-HT, au travers des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, inhibe l'accumulation d'AMPC préalablement stimulée par la forskoline (De Vivo et Maayani, 1986). Le même effet a été observé sur des cultures de neurones corticaux et hippocampiques (Dumuis, et al., 1988). D'autres auteurs ont montré que la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au niveau de l'hippocampe et des noyaux du raphé active les canaux « GIRK » pour « G-protein-coupled inward rectifying potassium » (Saenz del Burgo, et al., 2008). De plus, il semble que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> soient liés à la voie « MAPK » (pour « mitogen activity protéine kinase ») au travers des protéines ERK 1 et 2 (pour « extracellular signal-regulated kinase 1/2 ») (Polter et Li, 2010). La grande variété des signaux de transduction de l'information et des messagers secondaires peut expliquer qu'une même molécule ait des actions pharmacologiques différentes au niveau des autorécepteurs et des hétérorécepteurs (Lanfumeu et Hamon, 2000). D'autre part, des variations régionales de la sous-unité  $\alpha$  des protéines G liées aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ont été mises en évidence (Mannoury la Cour, et al., 2006). Cette étude démontre qu'au niveau cortical, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> interagissent autant avec les protéines G $\alpha_{i0}$  et

$G\alpha_{i3}$ . En revanche, au niveau de l'hippocampe, la sous-unité  $\alpha_{i0}$  semble majoritairement impliquée par rapport à  $\alpha_{i3}$ . A contrario, seules les protéines  $G\alpha_{i3}$  sont activées par les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> des noyaux du raphé antérieur. L'ensemble de ces données peut expliquer que certaines molécules agissent comme des agonistes complets au niveau du NRD, mais seulement comme des agonistes partiels dans l'hippocampe (Sprouse et Aghajanian, 1988).

Une autre notion importante mérite d'être soulignée. En effet, comme la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> existent sous deux conformations différentes : les récepteurs de « haute affinité », effectivement couplés aux protéines G et fonctionnels ; les récepteurs de « basse affinité », découplés et considérés comme non fonctionnels (Emerit, et al., 1990 ; pour revue Kobilka, 1992). Ainsi, il est postulé que les agonistes de ces récepteurs se fixent spécifiquement sur les récepteurs fonctionnels, alors que les antagonistes se fixent indifféremment sur l'ensemble des récepteurs, reflétant la densité totale. Cette dualité conformationnelle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> peut être utilisée pour déterminer la proportion de récepteurs fonctionnels au sein d'une structure donnée (Aznavour, et al., 2006 ; Aznavour et Zimmer, 2007).

## **5. Agents pharmacologiques et utilisations thérapeutiques**

Au fil du temps, un nombre important de ligands des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été mis au point, allant des agonistes complets aux agonistes partiels et aux antagonistes. Le développement de ces molécules, en général à visées thérapeutiques, a conduit à la synthèse d'outils pharmacologiques qui ont beaucoup apporté à la connaissance des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. C'est le cas du 8-OH-DPAT qui, utilisé depuis les années 80, est considéré comme un agoniste total (pour revue Pineyro et Blier, 1999). Le premier antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> à être découvert fut le WAY-100635 (Cliffe, et al., 1993).

Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ont été, depuis longtemps, impliqués dans la physiopathologie et la thérapie des troubles de l'anxiété et la dépression. En ce qui concerne la dépression, de nombreuses données confirment l'implication majeure des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> présynaptiques (pour revue Lacivita, et al., 2012) et une étude récente confirme leur importance dans la réponse aux traitements antidépresseurs (Richardson-Jones, et al.,

2010). Récemment, plusieurs études révèlent que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont des cibles prometteuses pour le traitement des effets secondaires extrapyramidaux des médicaments antipsychotiques ou de la maladie de Parkinson (pour revue Iderberg, et al., 2012).

## **6. Implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la maladie d'Alzheimer**

La compréhension grandissante des propriétés fonctionnelles des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, associée à la connaissance de leur distribution et de leur intégration dans la régulation du SNC, a conduit certains auteurs à étudier la place de ces récepteurs dans la MA, tant au niveau physiopathologique qu'au niveau thérapeutique. Initialement plusieurs équipes ont révélé l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans les processus cognitifs par leur capacité modulatrice sur les autres systèmes de neurotransmission, notamment glutamatergique et cholinergique.

En effet, les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> peuvent améliorer la cognition en abaissant l'inhibition produite par la 5-HT endogène sur les neurones pyramidaux et ainsi augmenter la transmission glutamatergique (Bliss et Collingridge, 1993). Cette capacité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été mise à l'épreuve sur plusieurs modèles animaux. Ainsi, le WAY-100635 montre la capacité de réduire les déficits cognitifs induits, chez le primate, par l'injection de dilzocipine, un antagoniste glutamatergique des récepteurs NMDA (Harder et Ridley, 2000). Sur des modèles de déficit cognitif cholinergique, induit par section des voies cholinergiques au niveau du fornix chez le primate ou par injection de scopolamine (un antagoniste des récepteurs muscarinique) chez le rat, le WAY-100635 montre, là encore, la capacité de réduire ces déficits (Carli, et al., 1997 ; Harder, et al., 1996). En ce qui concerne la MA, le déficit cholinergique a été le premier étudié et représente la cible privilégié des thérapeutiques actuelles. Cependant, certaines données suggèrent que le système glutamatergique est lui aussi, et de façon importante, déficitaire dans la MA (Davis, et al., 1999). Le glutamate, qui est un neurotransmetteur excitateur majeur, est capable d'améliorer la cognition et de déclencher des phénomènes physiologiques comme la potentialisation à long terme, connue pour jouer un rôle dans l'apprentissage et la mémoire (Morris, et al., 1986 ; Staubli, et al., 1994). Ces données ont amené certains auteurs à penser que les antagonistes de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourraient être efficaces dans le traitement des déficits cognitifs associés à la MA (Schechter, et al.,

2002). Ces mêmes auteurs ont testé un antagoniste 5-HT<sub>1A</sub>, le lecozotan, dans le traitement symptomatique de la MA. Le lecozotan augmente de façon significative la libération d'acétylcholine et de glutamate dans l'hippocampe, ce qui suggère que le blocage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> potentialise les transmissions cholinergiques et glutamatergiques (Schechter, et al., 2005). Cette approche est encore à l'étude aujourd'hui et certains auteurs essaient d'associer les traitements usuels de la MA (les IAChE) avec des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (pour revue Lacivita, et al., 2012).

Une autre stratégie étudiée ces dernières années consiste à favoriser l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, qui pourrait améliorer la prise en charge des patients souffrant de MA. Cette stratégie est basée sur l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans les symptômes comportementaux (BPSD) de la MA. En effet, certains auteurs ont rapporté que la diminution de la liaison de l'agoniste 8-OH-DPAT, sur les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> du cortex temporal, est corrélée avec la sévérité de l'atteinte démentielle et le comportement agressif de certains patients (Lai, et al., 2003). Pour les auteurs, une densité diminuée des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans le cortex temporal semble être un bon facteur prédictif des comportements agressifs chez les patients Alzheimer. En 2007, une équipe japonaise a lancé une étude préliminaire sur 30 patients Alzheimer évalués pour leurs symptômes BPSD. Chez ces patients l'utilisation d'une dose de 20 mg par jour de tandospirone, agoniste partiel des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, améliore les symptômes comportementaux en deux à quatre semaines (Sato, et al., 2007). Ainsi, les agonistes 5-HT<sub>1A</sub> pourraient représenter une alternative aux traitements antipsychotiques classiques, utilisés dans le cadre de la MA pour traiter les symptômes BPSD et souvent mal tolérés par les patients. De plus, il a été montré que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> corticaux atténue les déficits cognitifs induits par l'injection de phénylcyclidine (PCP), un antagoniste des récepteurs au glutamate de type NMDA. Cette étude, réalisée chez le rat, avec un modèle de mémoire de travail appelé « la planche à trous », montre que l'injection de PCP diminue fortement les performances des rats. En revanche, la co-administration d'un agoniste 5-HT<sub>1A</sub>, le F15599, avec la PCP restaure de bonnes performances chez les rats (Depoortere, et al., 2010).

Il semble donc que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aient un rôle à jouer dans la prise en charge de la MA, tant au niveau comportemental qu'au niveau cognitif. Cependant, le ciblage thérapeutique des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> implique de connaître leur comportement au cours

de la MA, tant au niveau de leur expression qu'au niveau de leur fonctionnalité, c'est à dire du couplage entre le récepteur et les effecteurs intracellulaires.

Au niveau physiopathologique, quelques équipes se sont intéressées au devenir des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours de la MA. Une étude autoradiographique, réalisée avec l'agoniste 8-OH-DPAT tritié montre une diminution significative de la liaison de l'agoniste dans le cortex frontal de patients Alzheimer. Ce phénomène reflète une perte de densité importante des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans les cortex frontaux de ces patients (Middlemiss, et al., 1986). Plus récemment, une équipe a montré par immunohistochimie que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> hippocampiques de l'aire CA1 sont diminués uniquement aux stades avancés de la maladie (stades de Braak V/VI). De plus, cette réduction est corrélée de façon significative à la perte neuronale au niveau de CA1 (Mizukami, et al., 2011). Les données impliquant les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans les symptômes BPSD ont été confirmées par des études *post mortem*, réalisées sur des homogénats d'hippocampe de patients, qui montrent une altération des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> chez les patients Alzheimer pour lesquels un syndrome dépressif a été rapporté (Lai, et al., 2011). En revanche, la même équipe a montré que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> étaient surexprimés dans les cortex frontal et temporal des patients au stade précoce de la MA. De plus, cette surexpression est corrélée au déclin cognitif des patients, évalué par le score au test MMSE (Lai, et al., 2002).

## **D. Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans la MA**

### **1. Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>**

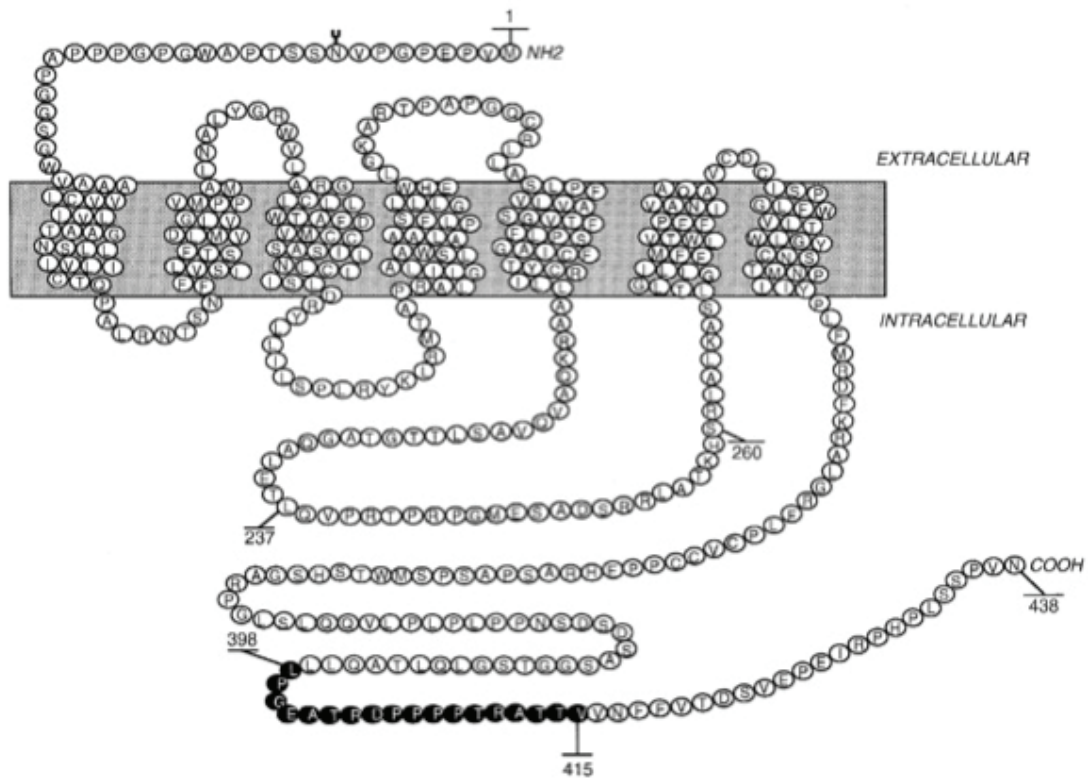
Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> font partie des récepteurs sérotoninergiques les plus récemment caractérisés. Contrairement à la majorité des récepteurs appartenant à cette famille, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont été découverts par des techniques de biologie moléculaire (pour revue Woolley, et al., 2004). En 1993, deux équipes indépendantes clonent le gène du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) à partir de striatum de rat (Monsma, et al., 1993 ; Ruat, et al., 1993a). Plus tard, ce récepteur 5-HT<sub>6</sub> sera mis en évidence chez l'Homme (Kohen, et al., 1996) puis chez la souris (Kohen, et al., 2001). C'est au début des années 2000 que les caractéristiques

fonctionnelles de ces récepteurs seront mises en évidence grâce aux premiers ligands spécifiques (pour revue Glennon, 2003).

## 2. Structure

Dès la découverte des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, leur séquençage fut réalisé chez les rongeurs (rat et souris) et chez l'Homme. Le gène du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, appelé HTR6, code une protéine de 440 aa chez l'Homme et la souris, alors que chez le rat, la protéine fait 438 aa (IUPHAR Database, [www.iuphar-db.org](http://www.iuphar-db.org)). Il existe une forte homologie de séquence entre les protéines des différentes espèces qui atteint 97 % entre le rat et la souris et 89 % entre l'Homme et la souris (Kohen, et al., 2001). Chez l'Homme, le gène HTR6 est situé sur le chromosome 1, en position 1p36-p35 (Kohen, et al., 1996). Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fait partie de la famille des RCPG, il possède donc une structure à 7 domaines transmembranaires. La partie N-terminale extracellulaire est relativement courte (27 aa), ainsi que la troisième boucle intracytoplasmique (57 aa chez l'Homme). En revanche, la partie C-terminale intracellulaire est longue (120 aa) (pour revue Woolley, et al., 2004) (Figure 22).

Le gène codant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain possède deux introns situés dans les parties codant les troisièmes boucles cytoplasmique et extracellulaire. Bien qu'aucun épissage alternatif n'ait été décrit chez le rat ou la souris, une telle variation a été rapportée chez l'Homme. En effet, une équipe a démontré l'existence d'un épissage alternatif à partir d'ADN du noyau caudé humain (Olsen, et al., 1999). Le transcrit variant, résultant de cet épissage alternatif, présente une délétion de 289 paires de bases, allant de la région codant le quatrième domaine transmembranaire jusqu'à celle codant la troisième boucle intracellulaire. Il en résulte une protéine tronquée et non fonctionnelle, contenant seulement 10 aa dans sa partie C-terminale. Ce transcrit variant de la protéine 5-HT<sub>6</sub> est observé uniquement dans les noyaux caudés et la substance noire du cerveau humain (Olsen, et al., 1999).



**Figure 22 :** Structure moléculaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub> du rat (d'après Gerard, et al., 1997). La séquence peptidique en noire, Leu<sup>398</sup> – Val<sup>415</sup>, fut utilisée pour la synthèse de l'anticorps spécifique.

Pour finir, il existe un polymorphisme de fragments de restriction en position 267 du gène HTR6 entre une base azotée cytosine et une thymine. De cet échange, noté C267T, résulte une mutation silencieuse dans la première boucle extracellulaire sans changement dans la séquence d'aa de la protéine. Certains auteurs ont suggéré que la fréquence de ce polymorphisme peut altérer la stabilité de l'ARN issu du gène HTR6 (Branchek et Blackburn, 2000). A partir de cette hypothèse, de nombreuses études d'association génétique, entre le polymorphisme C267T et des troubles du SNC, ont été réalisées. Ainsi, il semble que le génotype homozygote 267T/T soit associé à une meilleure réponse thérapeutique à la clozapine chez des patients schizophrènes d'origine chinoise (Lane, et al., 2004 ; Yu, et al., 1999). Ces résultats ont été confirmés sur des cohortes de patients d'origines britannique et espagnole mais n'ont pas été reproduits chez des patients américains (Masellis, et al., 2001). D'autres études d'association ont été réalisées dans le contexte de la MA, mais avec des résultats contradictoires. Tout d'abord, Tsai et coll. ont montré, sur une cohorte de 92 patients d'origine chinoise possédant l'allèle 267C, une augmentation du risque de MA par



rapport à un groupe contrôle apparié en sexe et en âge (Tsai, et al., 1999). Si ces résultats ont été reproduits sur un second groupe de patients espagnols, cette association n'a pas été retrouvée sur une cohorte de patients d'origine germanique. De plus, l'équipe de Thome a montré une tendance inverse avec une augmentation de la fréquence du génotype homozygote 267T/T chez des patients Alzheimer comparés à des sujets sains (pour revue Thome, et al., 2001 ; Woolley, et al., 2004).

Ainsi, il semble que les études pharmacogénétiques du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restent encore un vaste champ d'investigation, notamment en raison de l'intérêt que suscitent les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> à cause de leur localisation dans le SNC.

### 3. Distribution

Une des particularités majeures des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> est leur localisation exclusive dans le SNC (Ruat, et al., 1993a). Les études s'intéressant à la transcription du gène HTR6 par des techniques de Northern Blot, d'hybridation *in situ* et de RT-PCR quantitative ont montré une distribution de l'ARNm des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum, les noyaux accumbens, le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et l'amygdale (Gerard, et al., 1996 ; Gerard, et al., 1997 ; Monsma, et al., 1993 ; Ruat, et al., 1993a ; Ward, et al., 1995).

C'est grâce à une technique immunohistochimique que la distribution de la protéine 5-HT<sub>6</sub> a été déterminée pour la première fois. Ce récepteur est présent au niveau des tubercules olfactifs, du cortex, des noyaux accumbens, du striatum, de l'hippocampe, du cervelet, du thalamus, de la substance noire, de la couche superficielle du colliculus supérieur ainsi que dans les noyaux des nerfs moteurs (trigéminal et facial) et dans l'hypothalamus (Gerard, et al., 1997 ; Hamon, et al., 1999 ; Roberts, et al., 2002). Ainsi, il semble qu'il existe une bonne correspondance entre la présence d'ARNm et la localisation de la protéine 5-HT<sub>6</sub>. Cependant, certaines régions font exception à cette correspondance. C'est le cas du thalamus, où la protéine est retrouvée alors que l'ARNm issu du gène HTR6 est indétectable. Inversement, les noyaux du raphé antérieur et l'hypothalamus montrent une quantité importante d'ARNm mais très peu de protéines. Cette discordance pourrait être due à une variation régionale de l'efficacité de traduction/transcription du gène HTR6 ou à un transport de la protéine à distance du site de synthèse (Gerard, et al., 1997 ; Ward, et al., 1995). Ce transport protéique est aussi retrouvé au sein de l'hippocampe. En effet, les couches de cellules granuleuses et

pyramidales ne présentent aucun marquage protéique, malgré la présence d'ARNm (Ward, et al., 1995). En outre, la protéine 5-HT<sub>6</sub> est retrouvée dans la partie CA1 et la couche moléculaire du gyrus denté. L'ensemble de ces données suggère que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont transportés depuis les corps cellulaires des couches granuleuses et pyramidales vers les aires dendritiques (Gerard, et al., 1997). On peut noter une variabilité inter espèces, entre la souris d'une part et le rat et l'humain d'autre part (Hirst, et al., 2003 ; Setola et Roth, 2003). Ainsi, les études pharmacologiques de ligands 5-HT<sub>6</sub> seraient plus transposables à l'Homme lorsqu'elles sont réalisées chez le rat. Les premières études *post mortem* réalisées chez l'Homme ont montré que la distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> semble être similaire à celle mise en évidence chez le rat (East, et al., 2002 ; Lorke, et al., 2006). Pourtant, des études récentes suggèrent une densité des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> fortement prédominante au niveau des noyaux caudés, du putamen et des noyaux accumbens, suivis par les aires limbiques (hippocampe et amygdale) et enfin par le cortex cérébrale (Marazziti, et al., 2012). Initialement, les études d'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique ont révélé que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> étaient présents uniquement sur les neurones, et plus précisément dans les compartiments dendritiques (Hamon, et al., 1999). Néanmoins, les études plus récentes tendent à prouver qu'ils peuvent aussi être exprimés sur des cellules gliales selon les régions cérébrales (Marazziti, et al., 2013). Les études autoradiographiques utilisant des traceurs antagonistes sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> comme le [<sup>125</sup>I]SB852525 ou le [<sup>3</sup>H]Ro 63-0563 ont confirmé la localisation précédemment décrite de ces récepteurs (Boess, et al., 1998 ; Hirst, et al., 2000 ; Roberts, et al., 2002).

Ce sont les études de lésions neuronales spécifiques qui ont permis de déterminer les types neuronaux exprimant les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. En effet, la destruction ciblée des neurones sérotoninergiques par la toxine 5,7 DHT n'a pas modifié, chez le rat, le niveau d'expression d'ARNm des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> suggérant ainsi qu'ils sont présents uniquement au niveau post-synaptique, et sur des neurones non-sérotoninergiques (Gerard, et al., 1996). La lésion chimique de l'axe dopaminergique nigro-striatal par la 6-hydroxydopamine n'a pas modifié le niveau de fixation du radiotracer [<sup>125</sup>I]SB852525, ce qui implique que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ne sont pas portés par des neurones dopaminergiques (Roberts, et al., 2002). De la même façon, la lésion spécifique des neurones du système cholinergique par la toxine 192-IgG-saporin n'a pas modifié la densité des ARNm 5-HT<sub>6</sub>, ce qui prouve qu'ils ne sont pas non plus présents sur des

neurones cholinergiques (Marcos, et al., 2006). Enfin, un double marquage ciblant les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et les neurones GABAergiques (anticorps GAD67) a démontré que plus de 20 % des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont co-localisés sur des neurones GABAergiques de l'hippocampe (Fone, et al., 2002).

#### **4. Propriétés fonctionnelles**

Il est généralement admis que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est lié à l'enzyme adénylate cyclase via la protéine G $\alpha_s$  (pour revue Millan, et al., 2008). Ainsi, la stimulation de ces récepteurs par un agoniste provoque l'accumulation d'AMP cyclique dans la cellule. Ce messenger secondaire va à son tour activer différentes cibles effectrices dont la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). C'est grâce à cet effet que l'on définit la notion d'agoniste et d'antagoniste de ces récepteurs. Bien que le couplage des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> à la protéine G $\alpha_s$  ait été largement décrit, une équipe a montré en 2008 l'existence d'un couplage à d'autres sous-unités de la protéine G $\alpha$  : G $\alpha_{i/o}$  ou G $\alpha_q$  (Dupuis, et al., 2008). De plus, le couplage des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> à une voie Ca<sup>2+</sup>-dépendante via une protéine G chimérique a été réalisé (Zhang, et al., 2003).

En plus des systèmes de transduction liés aux protéines G, d'autres voies de signalisation ont été révélées ces dernières années (pour revue Yun et Rhim, 2011). En effet, Yun et coll. ont démontré la liaison de la protéine Fyn, appartenant à la famille « non-receptor protein-tyrosine kinases », à la partie C-terminale de la protéine 5-HT<sub>6</sub>. Les mêmes auteurs ont montré que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> peuvent activer les protéines ERK1/2 via les voies PKA-dépendante et Fyn-dépendante (Yun, et al., 2007).

Enfin, ce groupe de recherche a identifié une seconde protéine interagissant avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> : la « Jun activation domain-binding protein 1 » ou Jab1. Ces auteurs émettent l'hypothèse que cette interaction 5-HT<sub>6</sub> - Jab1 aurait une importance majeure dans la survie des cellules en conditions hypoxiques, ou lors d'une ischémie cérébrale (pour revue Yun et Rhim, 2011).

L'existence de ces voies d'activation alternatives pourrait être un des éléments d'explication des effets cognitifs, paradoxalement similaires, des agonistes et des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (Ramirez, 2013).

## 5. Agents pharmacologiques et utilisations thérapeutiques

Rapidement après leur découverte, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont suscité un vif intérêt dans la communauté pharmacologique en raison de leur affinité pour les médicaments antipsychotiques et les antidépresseurs tricycliques (pour revue Woolley, et al., 2004). Dès lors, la recherche, aussi bien universitaire qu'industrielle, de ligands des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> n'a cessé de progresser, avec un certain succès.

Les progrès les plus significatifs ont été réalisés dans la synthèse d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub>, dont on dénombre plus d'une vingtaine de molécules aujourd'hui. Pour la plupart, ces molécules sont utilisées comme outils pharmacologiques. C'est le cas du Ro 04-6790 et du Ro 63-0563 dont les pKi respectifs sont de 7,3 et 7,9 (Sleight, et al., 1998). Ces deux antagonistes montrent une sélectivité 100 fois supérieure pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> par rapport aux autres récepteurs sérotoninergiques humains. D'autres antagonistes sont aussi largement utilisés, c'est le cas du SB-271046 (pKi 8,9) et du SB-258585 (pKi 8,5). Le premier semble être actif par voie orale, alors que le second a été radiomarqué à l'iode 125 puis utilisé pour déterminer la distribution précise des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> chez différentes espèces (Bromidge, et al., 1999 ; Hirst, et al., 2000).

Un certain nombre d'antagonistes 5-HT<sub>6</sub>, développés pour lutter contre les troubles cognitifs, font l'objet d'essais cliniques. Les principales molécules en essai de phase I sont le PRX-07034 de Epix Pharmaceuticals, Inc., les SYN 114 et 120 développés par Synosia Therapeutics, l'AVN 322 (Avineuro Pharmaceuticals) et le SUVN-502 (SuvenLife Sciences). Enfin, les laboratoires Roche développent le R-1485. D'autres molécules, développées pour les mêmes indications, sont d'ores et déjà en phase II. Il s'agit du Lu-AE-58054 de Lundbeck, le SB-742457 de GSK, le PF-05212365 de Pfizer et l'AVN-211 de Avineuro Pharmaceuticals.

En comparaison aux antagonistes, un faible nombre d'agonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont été développés. Nous pouvons citer le 2-ethyl-5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (EMDT), le EMD386088, le E-6801, le LY586713 et les WAY-466, WAY-208466 et WAY-181187 (pour revue Codony, et al., 2011 ; Shireman, et al., 2008).

Comme il a déjà été rappelé, les ligands 5-HT<sub>6</sub> sont aussi développés dans le but de lutter contre les désordres psychiatriques. Cet axe de recherche se base sur l'affinité des antipsychotiques pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et leur capacité d'altérer l'expression de l'ARNm issu du gène HTR6, après plusieurs jours d'administration chez le rat (East, et

al., 2002 ; Hirst, et al., 2000). Une autre piste à l'étude, concernant le potentiel thérapeutique des ligands 5-HT<sub>6</sub>, est leur action possible sur l'anxiété. En effet, l'utilisation d'oligonucléotides antisens (O.A.), qui permet d'inhiber la synthèse de la protéine correspondante à l'ARNm, provoque un comportement anxiogène chez les souris (Hamon, et al., 1999). Malgré les résultats contradictoires d'une autre équipe, montrant un effet anxiolytique des O.A., il semble que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> soient impliqués dans la physiopathologie de l'anxiété (Yoshioka, et al., 1998). Enfin, des ligands 5-HT<sub>6</sub> agonistes ou antagonistes sont aussi développés pour leur action antidépressive (pour revue Wesolowska, 2010). Toutefois, de toutes les maladies cibles que les 5-HT<sub>6</sub> sont susceptibles de traiter, les troubles cognitifs, notamment ceux liés à la MA, attirent le plus d'attention.

## **6. Implication des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans la maladie d'Alzheimer.**

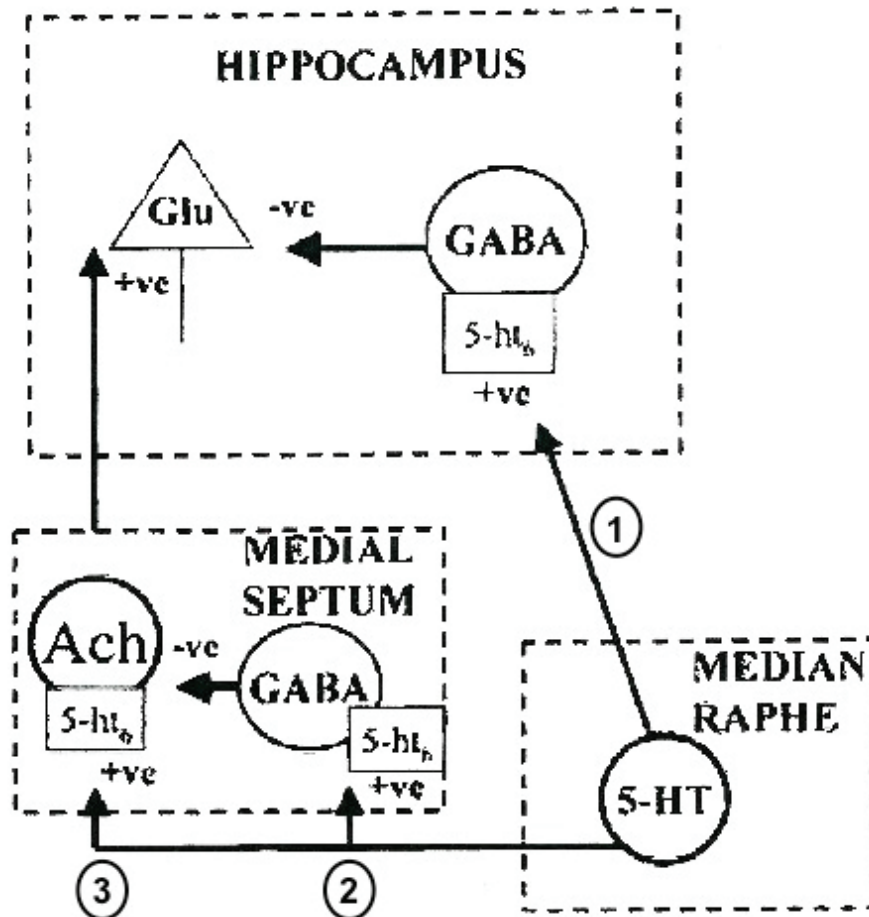
Une grande partie des études précliniques et cliniques qui utilisent les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> s'attachent à étudier leurs effets sur les processus cognitifs, aussi bien physiologiques que pathologiques. L'histoire de la fonction des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans les processus mnésiques remonte aux années de leur découverte.

En 1995, l'équipe de Bourson montra que la « down-régulation » des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, provoquée par l'utilisation d'O.A., entraîne des comportements d'étirement et de bâillement chez le rat (Bourson, et al., 1995). Ces effets furent reproduits avec l'antagonistes Ro 04-6790 (Bentley, et al., 1999). Dans ces deux études, les bâillements étaient dose-dépendants, et inhibés par l'ajout d'antagonistes muscariniques, la scopolamine et l'atropine en l'occurrence. Ces études laissent penser que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> régulent la neurotransmission cholinergique centrale, idée qui entre en résonance avec l'hypothèse cholinergique de la MA.

Par la suite, de nombreuses études ont confirmé l'action pro-cognitive des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> (pour revue Upton, et al., 2008). Effectivement, de nombreux antagonistes, tels que le SB-271046 ou le Ro 04-6790, ont la capacité de restaurer les déficits cognitifs induits par le blocage des récepteurs muscariniques centraux. Ces expériences ont été effectuées sur différents tests comportementaux chez les rongeurs, où chaque paradigme expérimental est censé modéliser un système mnésique. Ainsi, une étude réalisée en 2009 montra comment le blocage des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, par le SB-271046

injecté à la dose de 10 mg/kg en intra-péritonéale, améliorait les performances de souris adultes dans une tâche de reconnaissance spatiale. De plus, ce blocage inversait les déficits de consolidation mnésique liés à l'âge. Les auteurs soulignent que ces paradigmes expérimentaux, notamment le labyrinthe en Y utilisé dans la tâche de reconnaissance spatiale, sont considérés comme des modèles de mémoire épisodique. Ceci renforce l'hypothèse d'une action bénéfique des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans le traitement de la MA (Da Silva Costa, et al., 2009). Plus récemment, les mêmes chercheurs ont précisé que, paradoxalement, l'interaction des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> avec le système cholinergique prédomine sur certains systèmes mnésiques seulement, n'incluant pas la mémoire épisodique. C'est pourquoi, en considérant l'intérêt thérapeutique potentiel des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> dans les troubles mnésiques liés à l'âge ou aux maladies neurodégénératives, il semble important d'explorer les interactions des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> avec d'autres systèmes de neurotransmission (Da Silva Costa-Aze, et al., 2012).

Au regard de la localisation importante de récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sur les neurones GABAergiques, certains auteurs suggèrent que la régulation exercée par ces récepteurs sur la transmission cholinergique pourrait se faire via une inhibition GABAergique (pour revue Woolley, et al., 2004). De plus, au sein de l'hippocampe, les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé innervent notamment des neurones GABAergiques inhibiteurs exprimant des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Ainsi, la transmission glutamatergique hippocampique pourrait être régulée par les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> via une inhibition GABAergique (Figure 23).



**Figure 23 :** Schéma représentatif de la localisation et des interactions potentielles des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> avec les voies cholinergique, GABAergique et glutamatergique de l'hippocampe et du septum médian, impliquées dans la cognition. Les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> vont bloquer l'activation tonic exercée, par l'innervation sérotoninergique du raphé médian, sur les interneurons GABAergiques inhibiteurs de l'hippocampe (1) et du septum médian (2). Ainsi, les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> vont augmenter le relargage de glutamate et d'acétylcholine septohippocampique (3) (d'après Woolley, et al., 2004).

Pour finir, si les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> paraissent un outils prometteur pour lutter contre les troubles cognitifs liés à la MA, les agonistes, bien que moins nombreux, le sont aussi. En effet, l'agoniste E-6801 a montré, à une dose non active par elle-même, la capacité d'augmenter l'efficacité de la Mémantine et du Donopézil (Kendall, et al., 2011).

## II. Imagerie fonctionnelle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>

### A. Les radiotraceurs TEP agonistes et le couplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA

#### 1. Rationnel

Dans le chapitre consacré à la MA, nous avons vu que la symptomatologie ne s'exprime que lorsque la maladie est à un stade déjà bien avancé. De plus, le corps médical considère aujourd'hui qu'il y a un continuum dans la progression de la maladie, allant du sujet sain à la MA et comprenant le stade MCI. Dans ce contexte, l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourrait apporter des informations supplémentaires à la compréhension de l'expression clinique des symptômes de la MA.

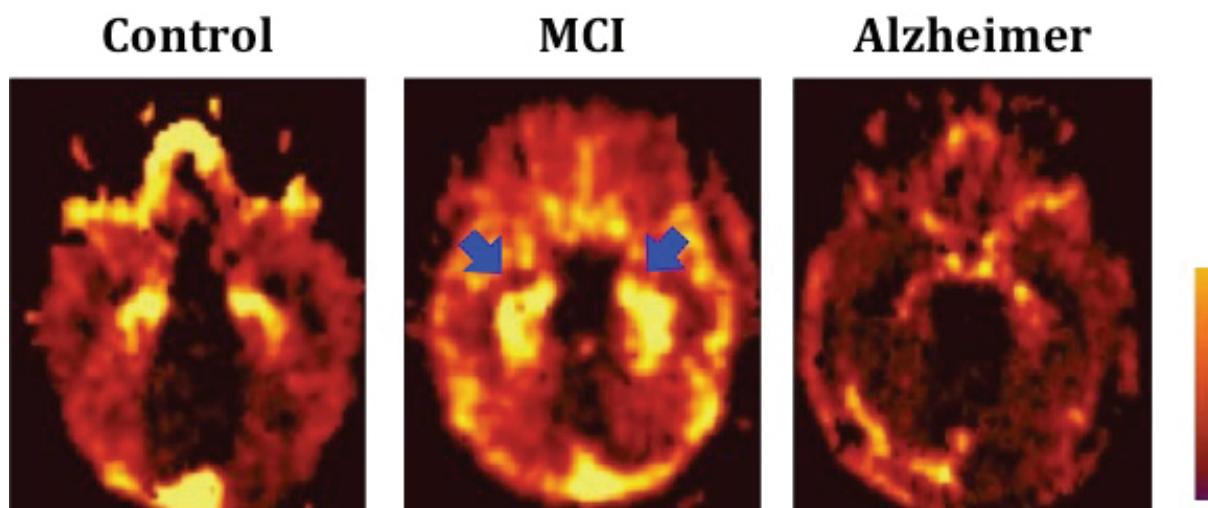
En 2007, une équipe nord-américaine a réalisé une étude d'imagerie TEP avec l'antagoniste WAY-100635 marqué au carbone 11. Les résultats de cette étude montrent une diminution du potentiel de liaison (« binding potential » BP, qui est le rapport entre la densité de récepteurs et l'affinité du ligand pour le récepteur) du [<sup>11</sup>C]WAY-100635 de 20 à 33 % dans le cortex temporal médian de patients ayant une MA légère à modérée, en comparaison à des sujets contrôles (Lanctot, et al., 2007). Les auteurs rapportent que la diminution du BP dans le LTM est corrélée au déclin cognitif des patients. Ainsi, ils émettent l'hypothèse que la diminution des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourrait être impliquée dans les troubles cognitifs des patients Alzheimer légers à modérés. Une autre équipe a étudié l'atteinte sérotoninergique chez un groupe de patients Alzheimer diagnostiqués cliniquement et biologiquement, au moyen de l'imagerie TEP avec un autre antagoniste 5-HT<sub>1A</sub>, le [<sup>18</sup>F]MPPF. Cette équipe de l'université de Californie a observé une diminution progressive de la fixation hippocampique du [<sup>18</sup>F]MPPF avec la progression de la maladie, c'est à dire depuis les sujets sains vers les patients MCI puis les patients Alzheimer avérés (Kepe, et al., 2006). L'interprétation proposée par les auteurs est que la diminution du marquage au [<sup>18</sup>F]MPPF serait le reflet de la perte des neurones pyramidaux hippocampiques qui portent les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

Cependant, une autre étude d'imagerie TEP au [<sup>18</sup>F]MPPF a été réalisée en parallèle avec des résultats sensiblement différents. Les auteurs de cette étude, effectuée à Lyon sur une cohorte de 10 patients Alzheimer, 11 aMCI et 21 sujets sains, ont choisi une analyse différente (Truchot, et al., 2007). En effet, compte tenu de l'atrophie hippocampique



importante constatée dans la MA, l'équipe lyonnaise a appliqué une correction de volume partiel à la mesure de la fixation hippocampique. Cette correction de volume partiel a été démontrée nécessaire dans les cas de perte volumique importante (Costes et Reilhac, 2006 ; Samuraki, et al., 2007). Grâce à cette technique, l'étude a montré chez les patients MCI une fixation hippocampique du [<sup>18</sup>F]MPPF accrue comparativement au groupe de sujets sains. En revanche, le groupe de patients Alzheimer a présenté une diminution significative de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF par rapport au groupe de sujets sains (Figure 21) (Truchot, et al., 2008 ; Truchot, et al., 2007). Ainsi, l'interprétation des résultats fut différente de celle de l'équipe de l'université de Californie car les valeurs de BP corrigé devenaient indépendantes de l'atrophie. Les auteurs de l'étude lyonnaise ont émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la densité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au stade MCI pourrait être le reflet de mécanismes de compensation, mis en jeu précocement au cours de l'évolution de la MA et dépassés à un stade plus avancé. Cette surexpression transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été reproduite, à Lyon, sur un modèle expérimental d'injection de peptide Aβ dans l'hippocampe de rat (Verdurand, et al., 2011). Lors de ce protocole, le gyrus denté des rats injectés montraient une augmentation du marquage autoradiographique au [<sup>18</sup>F]MPPF sept jours après l'injection, puis le marquage retournait à l'état basal au quatorzième jours et diminuait au vingt-huitième jours. Ces résultats confirment une sensibilité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aux peptides β-amyloïdes. Les auteurs de l'étude proposent que l'injection de peptide Aβ provoque une surexpression astroglial transitoire de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> en compensation de la perte neuronale locale.

L'ensemble de ces éléments indique que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourraient être un élément de l'hyperactivité hippocampique qui semble être un marqueur précoce de la MA (Putchá, et al., 2011). Cependant, des questions subsistent quant au caractère fonctionnel des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours du processus neurodégénératif de la MA. En effet, les RCPG, comme les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, sont connus pour influencer la cascade amyloïde, et inversement, la protéine β-amyloïde a montré la capacité de perturber le fonctionnement des RCPG (pour revue Thathiah et De Strooper, 2011). En effet, le couplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> à leur protéine G semble altéré dans le cortex frontal de patients Alzheimer (Weinstein, et al., 1996).



**Figure 21** : Images TEP de la fixation cérébrale du  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ , représentatives des groupes étudiés, chez un témoin (apparié en sexe et en âge), un sujet MCI et un patient Alzheimer. Les flèches bleues pointent l'augmentation significative de la fixation du radiotracteur chez les patients MCI (d'après Truchot, et al., 2007).

Dans ce contexte, deux radiotraceurs TEP agonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ont été étudiés dans notre laboratoire. Il s'agit du  $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$  et du  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ . Ces deux radiotraceurs ont une forte affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, ainsi qu'une très grande sélectivité. Ils ont montré, *in vitro*, la capacité de cibler préférentiellement les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> couplés à leurs protéines G (Lemoine, et al., 2012 ; Lemoine, et al., 2010).

## 2. Objectif

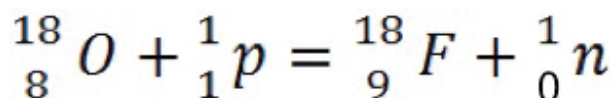
Les critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer ont connu des évolutions récentes, et prennent aujourd'hui en compte les biomarqueurs spécifiques de la maladie. Une place prépondérante est accordée aux marqueurs biochimiques du LCR, cependant les marqueurs d'imagerie fonctionnelle TEP attirent de plus en plus d'attentions. En outre, l'imagerie TEP permet aujourd'hui d'évaluer les répercussions du processus neurodégénératif de la MA sur certains systèmes de neurotransmission. Notamment le système sérotoninergique, où les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> semblent augmenter transitoirement, et de façon précoce, avant de subir une nette diminution avec la progression de la maladie.

Néanmoins, les radiopharmaceutiques TEP utilisés jusqu'à présent pour étudier les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ne renseignent pas sur les caractéristiques fonctionnelles de ceux-ci. Notre objectif est d'explorer la fonctionnalité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours de la MA, au moyen de l'imagerie TEP au [<sup>18</sup>F]F15599, un agoniste 5-HT<sub>1A</sub> qui cible spécifiquement les récepteurs fonctionnels. En partant de l'hypothèse que l'augmentation transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, visualisée en TEP, signe un phénomène compensatoire précoce, nous cherchons à déterminer, par l'imagerie des récepteurs fonctionnels, les mécanismes moléculaires qui soutiennent cette expression.

### 3. Matériels et méthodes

#### a) Radiosynthèses

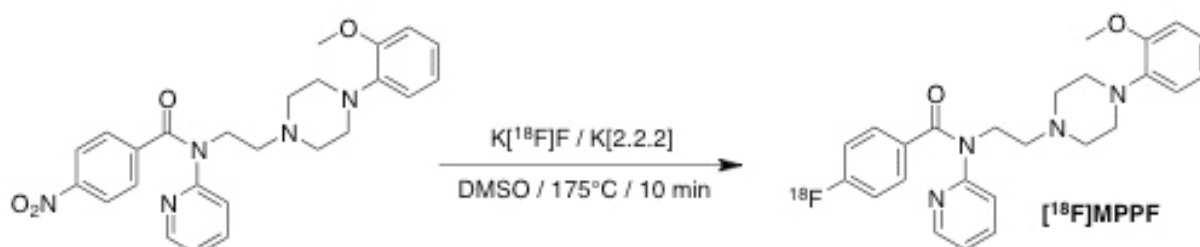
Le radioisotope fluor 18 ( $^{18}\text{F}$ ) est produit grâce au cyclotron par la réaction (p,n) sur une cible d'eau enrichie en oxygène 18 :



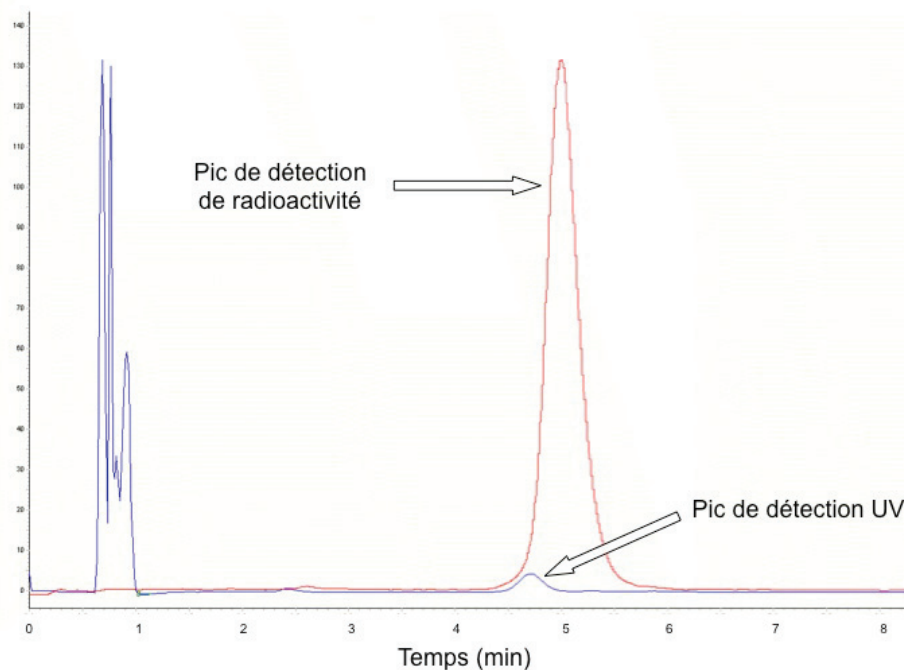
Le  $^{18}\text{F}$  obtenue est sous sa forme fluorure  $^{18}\text{F}^-$  puis est concentré sur une cartouche d'extraction en phase solide, ce qui permet de recycler l'eau enrichie ayant servi à sa production. Les radiosynthèses, qui consistent en une substitution nucléophile, sont réalisées par un automate de fluoration placé en cellule blindée.

##### i. Radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$

Le  $^{18}\text{F}$  est rendu anhydre par séchage avant le radiomarquage. Puis a lieu la réaction de substitution nucléophile aromatique, en présence d'un catalyseur le Kryptofix 2.2.2, à  $170^\circ\text{C}$  dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 10 minutes (Le Bars, et al., 1998) (Figure 27). Une pré-purification de ce produit est réalisée afin d'éliminer les matières hydrophiles, puis une chromatographie liquide haute pression (HPLC) est effectuée pour purifier le radiopharmaceutique. Le  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  est ensuite collecté, conditionné et soumis à un contrôle qualité pharmaceutique (Figure 28), qui comprend une HPLC avec détection UV et de radioactivité. Le radiotracteur  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  a une bonne activité spécifique (entre 37 et 111 GBq/ $\mu\text{mol}$ ) et sa pureté radiochimique est de 99%.



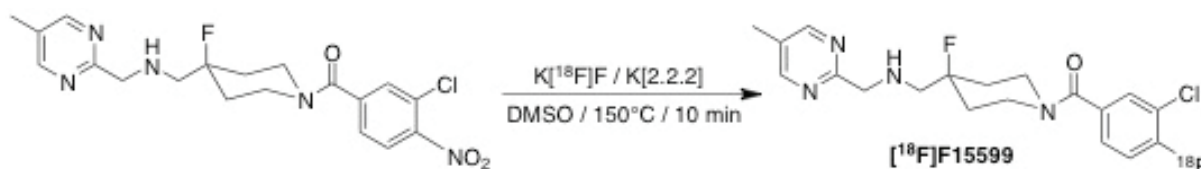
**Figure 27 :** Schéma de la radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ .



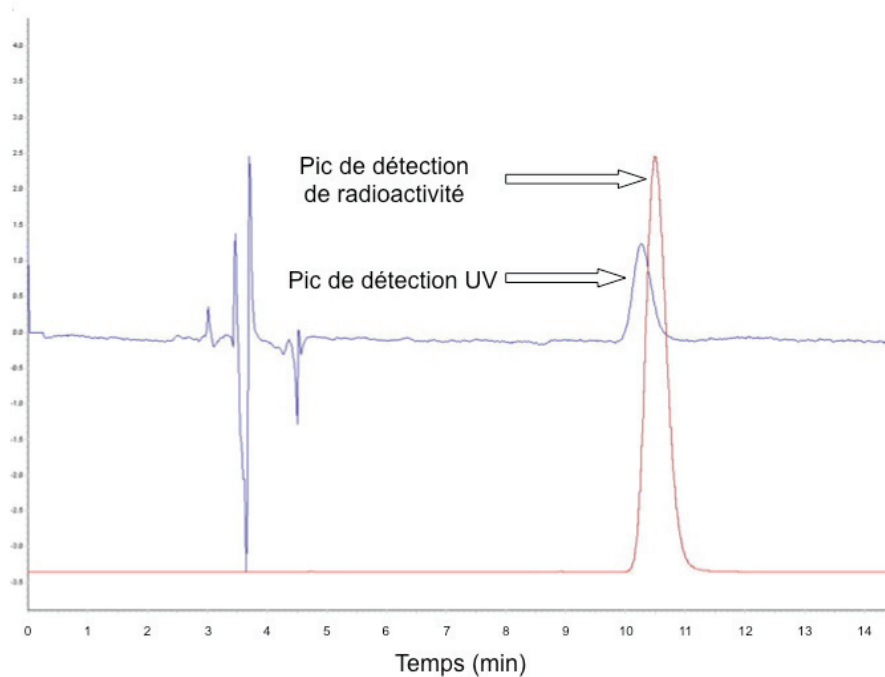
**Figure 28 :** Chromatogramme du contrôle qualité du  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ . L'absorbance UV à 254 nm et la radioactivité permettent le calcul de la pureté radiochimique, qui est supérieure à 99%.

ii. Radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$

Le précurseur nitré du F15599 a été synthétisé par les laboratoires Pierre Fabre. Le radiomarquage consiste là encore en une réaction de substitution aromatique du groupement  $\text{NO}_2$  du précurseur par le  $^{18}\text{F}$ . La réaction a lieu en présence du catalyseur Kryptofix 2.2.2 à  $150^\circ\text{C}$  dans du DMSO (Figure 29). Le  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$  subit les mêmes étapes de pré-purification sur colonne, purification par HPLC. Après la collecte, le  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$  est conditionné et contrôlé pharmaceutiquement (Figure 30). Ce radiotracer est obtenu avec une pureté radiochimique supérieure à 95% et une activité spécifique entre 40 et 85  $\text{GBq}/\mu\text{mol}$ .



**Figure 29 :** Schéma de la radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ .



**Figure 30 :** Chromatogramme du contrôle qualité du  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ . L'absorbance UV à 254 nm et la radioactivité permettent le calcul de la pureté radiochimique, qui est supérieure à 95%.

Pour établir une comparaison rigoureuse entre les autoradiographies au  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  et au  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ , les deux radiotraceurs ont été utilisés avec la même activité spécifique de 37 GBq/ $\mu\text{mol}$  (1 Ci/ $\mu\text{mol}$ ). Celle-ci a été obtenue par décroissance radioactive, dont le temps a été calculé en fonction de l'activité spécifique obtenue à la fin de la radiosynthèse.

### ***b) Recueil et préparation des échantillons de patients***

Les échantillons de cerveau des patients Alzheimer et des témoins ont été obtenus auprès de la banque de tissus Cardiobiotech (Groupement hospitalier EST – Hospices Civils de Lyon) et de la cérébrothèque du GIE Neuro-CEB (hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France), après soumission du protocole et accord des conseils scientifiques des deux organismes.

#### i. Prélèvement post mortem

Lorsque les patients, inclus dans différents protocoles de recherche, ou leurs familles, ont donné leur accord pour une autopsie avec prélèvement du cerveau, celui-ci est réalisé au plus tôt après le décès du patient. Le médecin anatomopathologiste procède au prélèvement du cerveau et à son conditionnement en vue des différents examens. Un hémisphère cérébral est fixé par une solution de formol, puis différentes parties du cerveau sont analysées par immunohistochimie pour déterminer l'envahissement par les plaques amyloïdes, le stade de Braak (taupathie), ainsi que les éventuelles pathologies associées (DFT, angiopathie amyloïde, synucléopathie). L'hémisphère controlatéral est coupé en tranche selon une progression antéro-postérieure, puis celles-ci sont congelées, à l'état frais, dans de la carboglace et conservées dans des congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figure 31).

#### ii. Sélection et préparation des échantillons

Pour notre étude, nous avons sélectionné les échantillons selon le stade de Braak des patients (au moment de leur décès), mesuré par immunohistochimie avec l'anticorps AT8. Tous les stades de Braak ont été choisis (Braak I à VI), les patients à un stade Braak 0 ont été sélectionnés comme témoins. Les patients présentant une synucléopathie, identifiée par immunohistochimie, ont été exclus pour éviter les interférences avec les variables de l'étude.

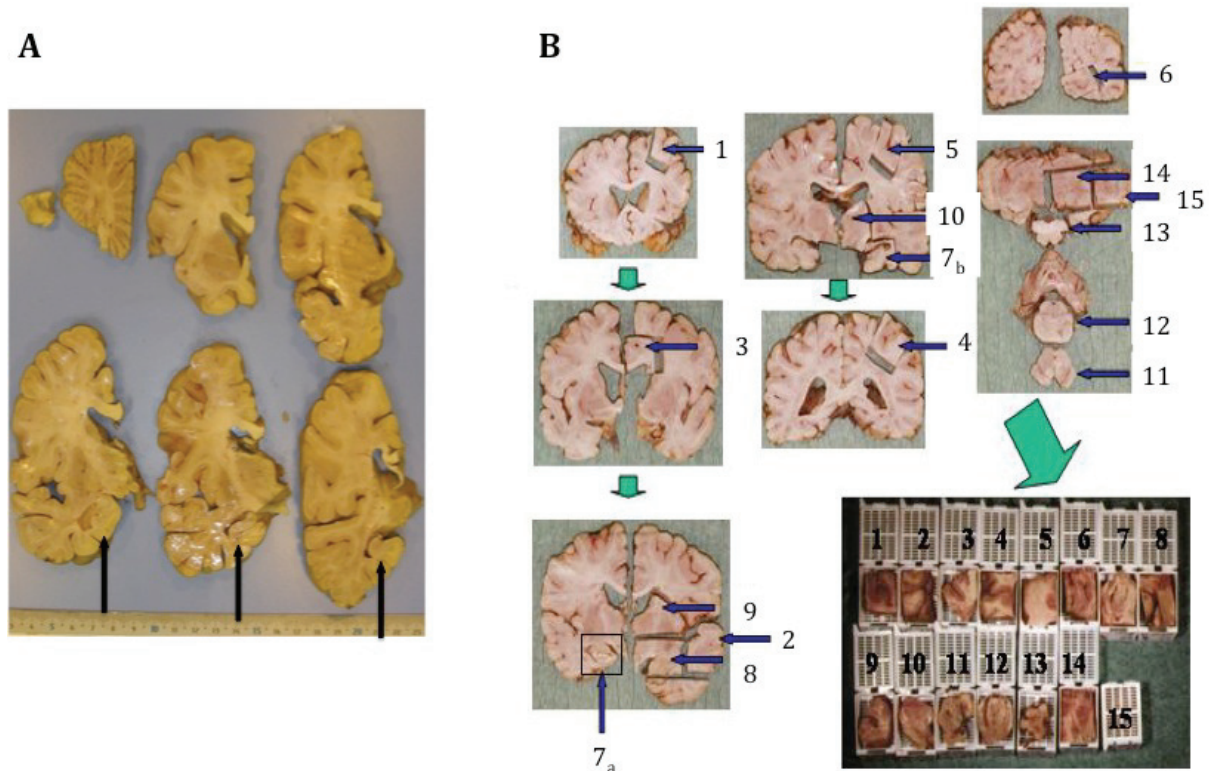
#### iii. Données recueillies

- Données épidémiologiques : âge au décès du patient, sexe, délai de prélèvement *post mortem*.
- Données anatomopathologiques et immunohistochimiques: charge amyloïde (anticorps bA4), taupathie (anticorps AT8).
- Pathologies associées : démence fronto-temporale, angiopathie amyloïde.

#### iv. Préparation des échantillons

Notre étude est focalisée sur l'hippocampe, une zone du cerveau particulièrement touchée par la MA. Après repérage neuroanatomique de l'hippocampe, sur la tranche de cerveau correspondant à sa localisation antéro-postérieure, celui-ci est prélevé en bloc.

Le reste de l'échantillon de cerveau est conservé tel quel au congélateur - 80°C. Des coupes coronales de l'hippocampe, de 30 µm d'épaisseur, sont alors réalisées au moyen d'un cryostat à - 20°C (Leica SM1850, Leica), puis fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Starfrost®). Les lames contenant les coupes sont ensuite conservées quelques jours à - 80°C avant les expériences d'autoradiographie.



**Figure 31 :** **A** Photo des coupes hémisphériques de cerveau frais congelé dans la carboglace (les flèches noires indique l'emplacement de l'hippocampe). **B** Photo du prélèvement systématique de 15 fragments fixés pour l'analyse immunohistochimique (1. Cortex frontal, 2. Cortex temporal, 3. Gyrus cingulaire, 4. Cortex pariétal, 5. Gyrus pré-postcentral, 6. Cortex occipital, 7a. Hippocampe antérieur, 7b. Hippocampe postérieur, 8. « basal forebrain », 9. Striatum, 10. Thalamus, 11. Tronc cérébral, 12. Pons, 13. Medulla, 14. Vermis, 15. Cervelet) (Dr. N. Streichenberger, communication personnelle).

### c) Autoradiographie quantitative *in vitro*

#### i. Principe et instrumentation

L'autoradiographie est une technique permettant la détection qualitative et quantitative de structures d'intérêt sur des coupes de cerveau. Cette détection se fait grâce à l'utilisation de radiotraceurs se fixant spécifiquement sur la structure moléculaire



d'intérêt. Dans notre étude, ce sont les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub> qui vont fixer les radiotraceurs [<sup>18</sup>F]MPPF et [<sup>18</sup>F]F15599.

L'appareil du CERMEP est le phospho-imageur de Fujifilm (BAS 5000, Fujifilm). L'écran utilisé avec le phospho-imageur est composé d'une fine couche de cristaux photostimulables déposés sur un support en polyester, le tout recouvert d'une fine couche protectrice en plastique. Lorsque l'échantillon à analyser est mis au contact de l'écran, les particules chargées, émises par le radiotraceur, vont déplacer les électrons de certains cristaux qui vont rester « piégés » de manière prolongée dans cet état transitionnel durable. L'énergie ainsi stockée va être libérée par stimulation de l'écran avec un faisceau de laser hélium-néon qui provoque une émission de lumière bleue. Cette luminescence est captée par un photomultiplicateur et l'image est constituée, point par point, par balayage de l'écran en quelques minutes.

## ii. Réalisation

Le jour de la radiosynthèse, les lames sériées, congelées à - 80°C, sont placées à température ambiante durant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées durant 20 minutes, à température ambiante, dans du tampon TBS-HCl pH 7.5 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, Sigma-Aldrich, France) contenant 37 kBq/ml (1 µCi/ml) de [<sup>18</sup>F]MPPF ou [<sup>18</sup>F]F15599. La fixation non spécifique des traceurs est déterminée par ajout de sérotonine en excès (10 µM) dans le bain d'incubation. A la fin de l'incubation, les lames sont lavées 90 secondes dans du tampon TBS-HCL pH 7.5 à 4°C, puis 90 secondes dans de l'eau distillée à 4°C avant d'être séchées par un léger flux d'air ambiant. Les lames sont ensuite apposées contre les écrans du phospho-imageur, dans une cassette, pendant 60 minutes. Les images sont révélées en quelques minutes par le logiciel « Image Reader », puis les régions d'intérêts sont tracées manuellement grâce au logiciel d'analyse « Multigauge » (Fujifilm, Raytest, Germany), à l'aide d'un atlas du cerveau humain. Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en psl/mm<sup>2</sup> (« phospho stimulated luminescence » par unité de surface). Elles seront ensuite exprimées en quantité de radiotraceur lié par milligramme de protéines (fmol/mg) grâce à la droite d'étalonnage. Les résultats obtenus sont comparés entre les groupes de patients Alzheimer à différents stades de Braak et les patients témoins pour chaque radiotraceur.

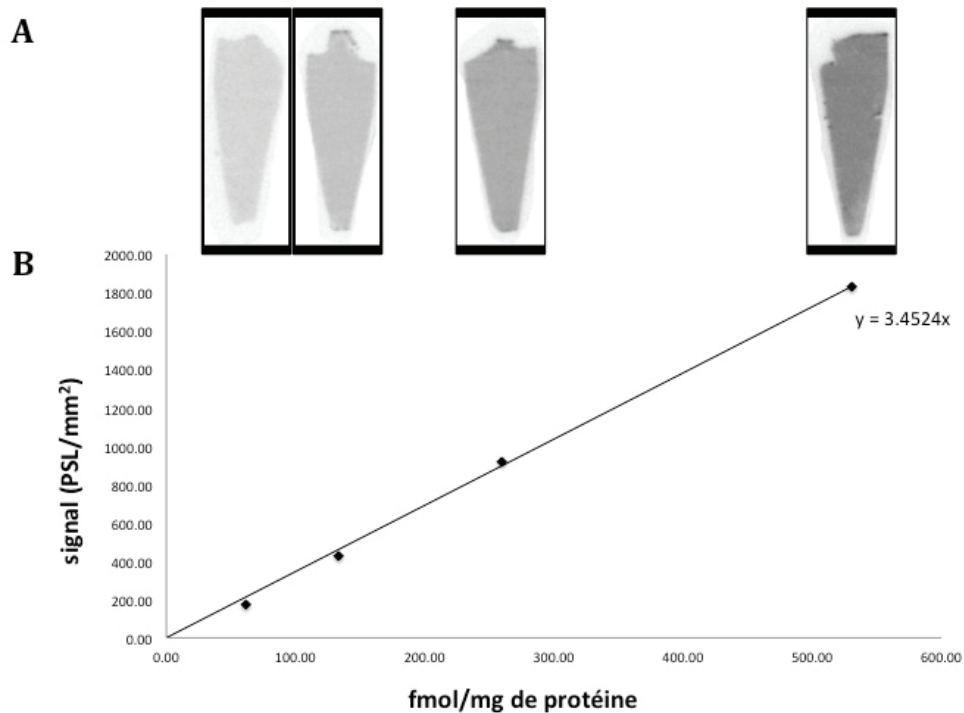
### iii. Gamme étalon

Pour obtenir une mesure quantitative de radiotracteur lié aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, nous avons réalisé une gamme étalon qui permet de convertir l'unité psl/mm<sup>2</sup> en fmol de ligand par mg de protéine. Cette gamme étalon est réalisée sur broyat de cerveau de rats.

Le rat est anesthésié en « flash » à l'isoflurane, puis le cerveau est prélevé après euthanasie par décapitation. Le cerveau est rincé à l'eau distillée puis immédiatement broyé par ultrasons dans 250 ml de tampon TBS-HCL pH 7.5 à 4°C, l'ensemble maintenu au frais dans de la glace. Le broyat est réparti dans quatre tubes Eppendorff, dont la tare a été réalisée pour déterminer le poids de tissus dans chaque tube. Ensuite, une quantité déterminée et croissante de radiotracteur est introduite dans chacun des tubes : 3.13 µCi, 6.25 µCi, 12.5 µCi et 25 µCi. Puis les tubes sont immergés dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à - 30°C par ajout de carboglace. Les broyats congelés sont extraits des tubes Eppendorf, puis coupés à 30 mm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat à - 20°C (Leica SM1850, Leica). Les coupes sont fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Starfrost®). La gamme étalon est apposée au contact des écrans du phospho-imager en même temps que les coupes de cerveaux des patients (Figure 32).

Parallèlement à la réalisation des coupes, une partie du broyat est utilisée pour doser des protéines présentes. Ce dosage de protéine a été réalisé sur un automate de biochimie Architect c8000 (Abbott Diagnostics, EUA) et a montré une teneur en protéine de 8% (± 0.92, n = 4) dans les broyats de cerveau. Ainsi, pour chaque tube nous pouvons calculer la quantité de radioligands introduite en fonction du poids de protéines (exprimée en fmol/mg de protéines).

Les régions d'intérêt dessinées sur les coupes de broyats sont analysées par le logiciel « MultiGauge », puis une droite étalon, tracée selon la fonction  $y = f(\text{fmol/mg})$ , permet la conversion des unités psl/mm<sup>2</sup> en fmol/mg de protéines (Figure 32).



**Figure 32 :** *A* Image autoradiographique de la gamme étalon, réalisée sur broyat de cerveau de rat. Les coupes représentatives sont disposées au dessus de leur point de gamm respectifs. *B* Droite étalon, représentant la mesure en PSL/mm<sup>2</sup> en fonction de la quantité de radiotracer introduite, d'équation  $y = f(\text{fmol/mg})$ .

#### iv. Couplage aux protéines G

Pour déterminer si le radiotracer se fixe aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> couplés à leur protéine G, nous utilisons l'agent pharmacologique Gpp(NH)p (5'-guanylyl imido diphosphate, Sigma-Aldrich, France). Cet analogue non hydrolysable du GTP (guanosyl tri phosphate) permet le découplage des récepteurs liés aux protéines G. Ainsi, nous réalisons en parallèle de l'autoradiographie classique, des bains d'incubation contenant 10 µM de Gpp(NH)p. Les lames présentes dans ces bains sont apposées aux mêmes écrans et en même temps que les lames des bains contrôles.

#### *d) Analyses statistiques*

L'analyse des images autoradiographiques, obtenues grâce au logiciel « Image Reader », a été réalisée par le logiciel « MutiGauge » (Fujifilm, Raytest, Germany). Le traitement statistique des résultats a été effectué au moyen du logiciel « Prism » pour Mac OS X (GraphPad Software Inc. EUA), selon un test non paramétrique de Mann-Whitney. Un p strictement inférieur à 0.05 était considéré comme significatif.

## 4. Résultats

### a) Données démographiques

#### i. Effectif étudié

Les hippocampes de dix-huit patients ont été obtenus et regroupés selon la classification de Braak. Les patients négatifs à l'examen immunohistochimique constituaient le groupe contrôle Braak 0 (n = 4), les patients positifs ont été classés dans les groupes Braak I/II (n = 4), Braak III/IV (n = 4) et Braak V/VI (n = 6). Les données épidémiologiques des patients sont résumées dans le tableau 4.

stades Braak	0	II	III - IV	V - VI
n	4	4	4	6
Age (années)	61.5 ± 5.4	73.5 ± 7.7	77.5 ± 8.1	83.2 ± 12.2
sexe M/F	4/0	3/1	2/2	2/4
DPM (heures)	29,8 ± 33,9	20,5 ± 9,9	54,75 ± 29,2	26,9 ± 3,9

**Tableau 4 :** Résumé des caractéristiques épidémiologiques des patients recrutés.

L'âge moyen des patients ne variait pas significativement entre les groupes Braak 0, Braak I/II, et Braak III/IV. Seul le groupe Braak V/VI montrait une différence significative avec le groupe contrôle (p = 0.029).

Le délai *post mortem* (DPM) de prélèvement ne variait pas significativement entre les groupes de l'étude (p<0.05). Un patient du groupe contrôle présentait un DPM de quatre-vingts heures, deux patients du groupe Braak III/IV présentaient eux aussi un DPM de quatre-vingts heures.

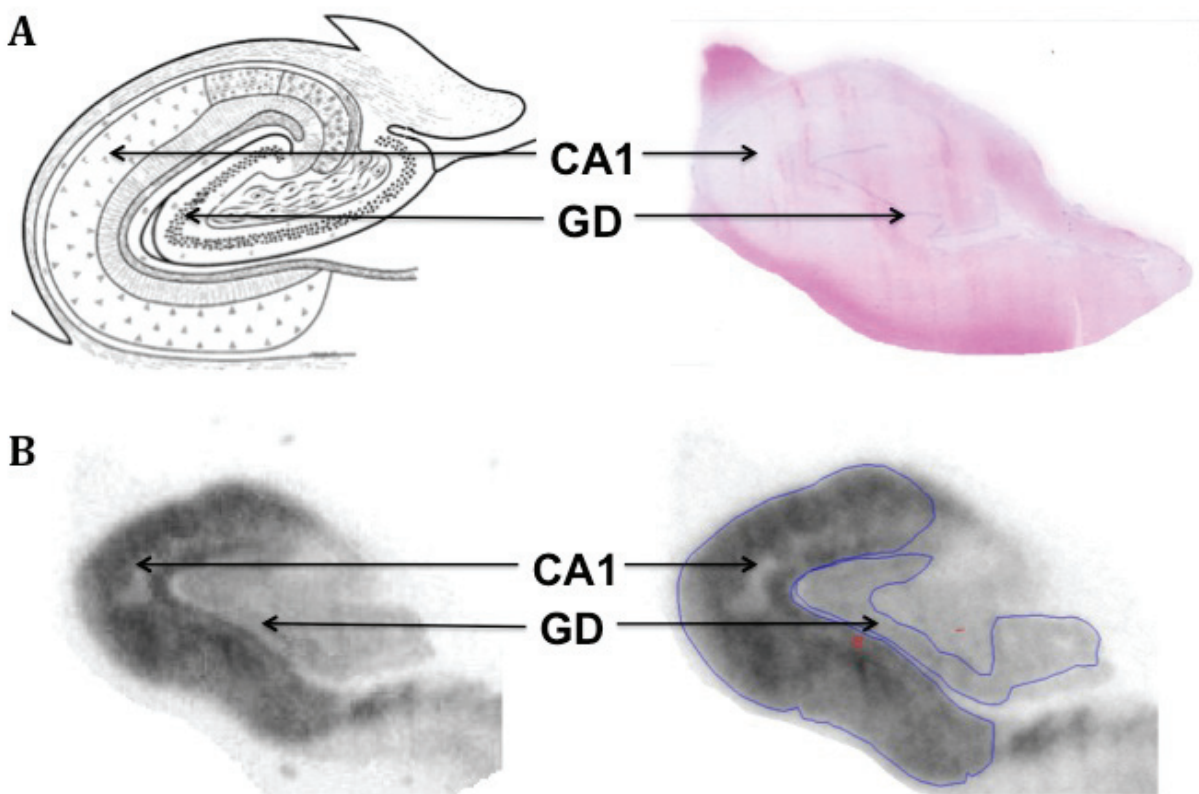
ii. Pathologies associées

Une angiopathie amyloïde a été retrouvée chez 39 % des patients : deux patients du groupe Braak I/II, un patient du groupe Braak I/IV et quatre patients du groupe Braak V/VI.

Une DFT a été rapportée chez un patient du groupe contrôle et chez un patient du groupe Braak I/II.

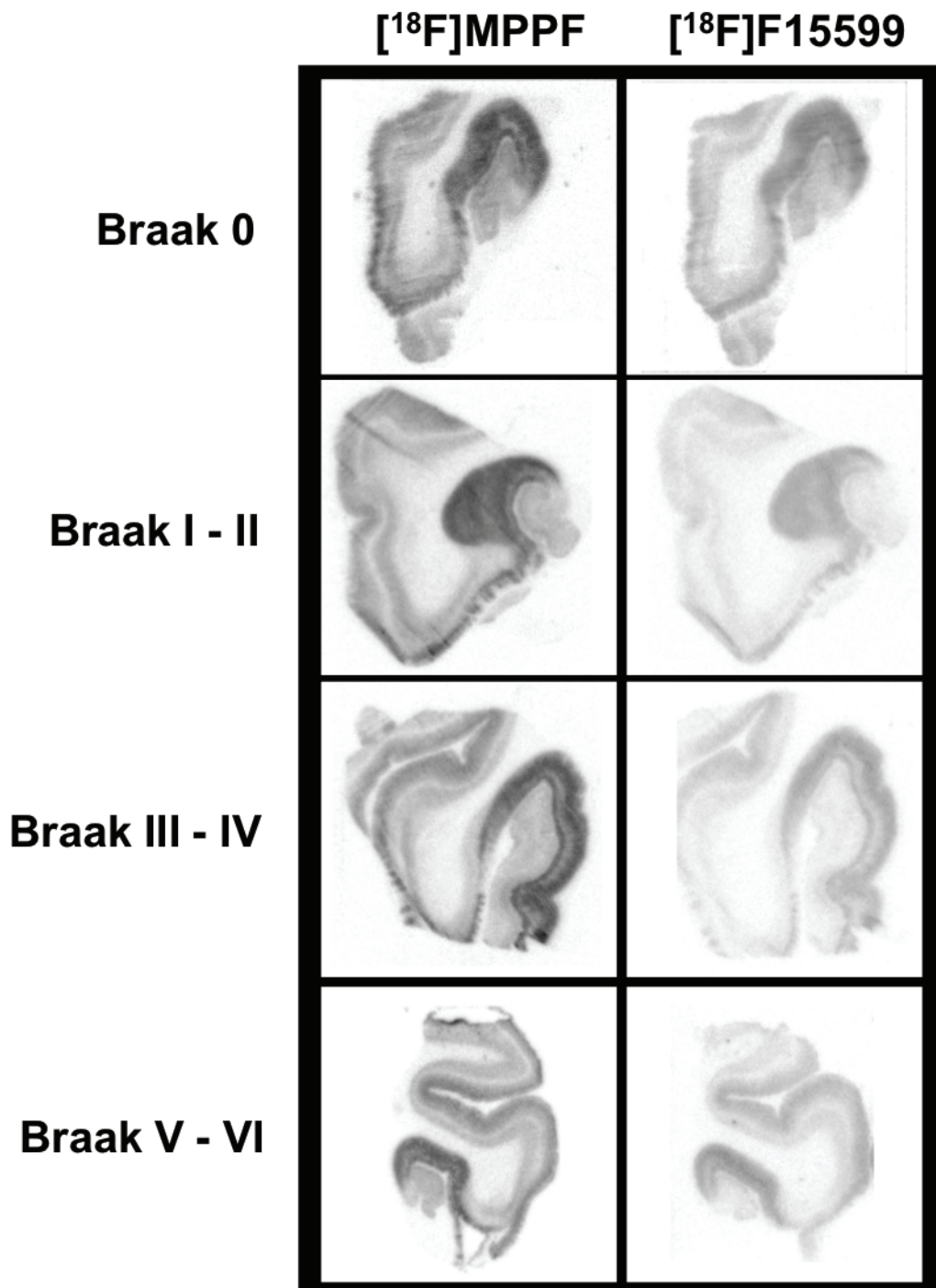
**b) Autoradiographies quantitatives**

i. Identification des régions d'intérêts



**Figure 33 :** Schéma représentatif de la procédure d'identification des régions d'intérêt. **A** correspondance anatomique entre l'atlas de l'hippocampe humain (Duvernoy, et al., 2005) et une coupe coronale d'hippocampe de patient (groupe contrôle) après coloration à l'éosine - hématoxyline. **B** Image représentative de la localisation autoradiographique du marquage spécifique des radioligands sur les coupes hippocampiques des patients et détermination des régions d'intérêt correspondantes. CA1, partie 1 de la corne d'Ammon ; GD, gyrus denté.

Les sous-régions de l'hippocampe, identifiées et mesurées en tant que régions d'intérêt (ROI pour « region of interest » en anglais), sont CA1 et le GD (Figure 33). Ces deux sous régions ont pu être identifiées et tracées sur tous les échantillons de patients intégrés dans l'études (Figure 34)






**Figure 34 :** Images autoradiographiques, [<sup>18</sup>F]MPPF versus [<sup>18</sup>F]F15599, des coupes hippocampiques de patients représentatifs des différents groupes de l'étude.

ii. Autoradiographie quantitative *in vitro*

(a) Fixation spécifique du [<sup>18</sup>F]F15599 sur les récepteurs couplés aux protéines G




Les expériences d'autoradiographie *in vitro* au [<sup>18</sup>F]F15599 ont été complétées par des expériences de compétition pharmacologique avec du Gpp(NH)p à 10 µM. Cet agent pharmacologique a la capacité de découpler les récepteurs de leur protéine G. Lors de ces expériences de compétition, les valeurs quantitatives moyennes de fixation du [<sup>18</sup>F]F15599, dans la région CA1, chutaient à 12.29 ± 1.27 fmol/mg de protéines pour le groupe contrôle, à 10.52 ± 1.60 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II, à 7.74 ± 1.68 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV et à 6.97 ± 1.19 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI. Ces valeurs ne variaient pas significativement du marquage non spécifique au [<sup>18</sup>F]F15599, déterminé par l'ajout de 10 µM de sérotonine dans le bain d'autoradiographie. La quantification du marquage non spécifique, pour l'ensemble des groupes, dans la région CA1 révélait une valeur de 7.77 ± 0.51 fmol/mg de protéines (Figure 35).

	CA1				
	Braak 0	Braak I - II	Braak III - IV	Braak V - VI	
[ <sup>18</sup> F]F15599	96,40 ± 29,33	82,06 ± 18,55	75,20 ± 22,32	78,68 ± 25,16	
[ <sup>18</sup> F]F15599 + GppNHp (10 µM)	12,29 ± 1,27	10,52 ± 1,60	7,74 ± 1,68	6,97 ± 1,19	
[ <sup>18</sup> F]F15599 + 5-HT (10 µM)	7,77 ± 0,51				

**Figure 35 :** Valeurs quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]F15599, dans la région CA1, lors des différents paradigmes expérimentaux d'autoradiographies *in vitro* (fmol/mg de protéines ± SEM). Les images autoradiographiques illustrent la diminution importante de l'intensité de fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 lors des compétitions pharmacologiques.

Dans la région du gyrus denté, les valeurs quantitatives moyennes de fixation du [<sup>18</sup>F]F15599, en présence de 10 µM, chutaient à 8.45 ± 0.91 fmol/mg de protéines pour

le groupe contrôle, à  $7.01 \pm 0.82$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II, à  $6.15 \pm 0.77$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV et à  $5.32 \pm 0.59$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI. Ces valeurs ne variaient pas significativement de la fixation non spécifique du [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, déterminée par l'ajout de  $10 \mu\text{M}$  de sérotonine dans le bain d'autoradiographie, et quantifiée à  $6.77 \pm 0.46$  fmol/mg de protéines (Figure 36).

Gyrus denté					
	Braak 0	Braak I - II	Braak III - IV	Braak V - VI	
[ $^{18}\text{F}$ ]F15599	$32,71 \pm 9,29$	$15,47 \pm 2,30$	$21,91 \pm 5,72$	$11,50 \pm 3,24$	
[ $^{18}\text{F}$ ]F15599 + GppNHp ( $10 \mu\text{M}$ )	$8,45 \pm 0,91$	$7,01 \pm 0,82$	$6,15 \pm 0,77$	$5,32 \pm 0,59$	
[ $^{18}\text{F}$ ]F15599 + 5-HT ( $10 \mu\text{M}$ )		$6,77 \pm 0,46$			

**Figure 36 :** Valeurs quantitatives de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, dans le gyrus denté, lors des différents paradigmes expérimentaux d'autoradiographies *in vitro* (fmol/mg de protéines  $\pm$  SEM). Les images autoradiographiques illustrent la diminution importante de l'intensité de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]F15599 lors des compétitions pharmacologiques.

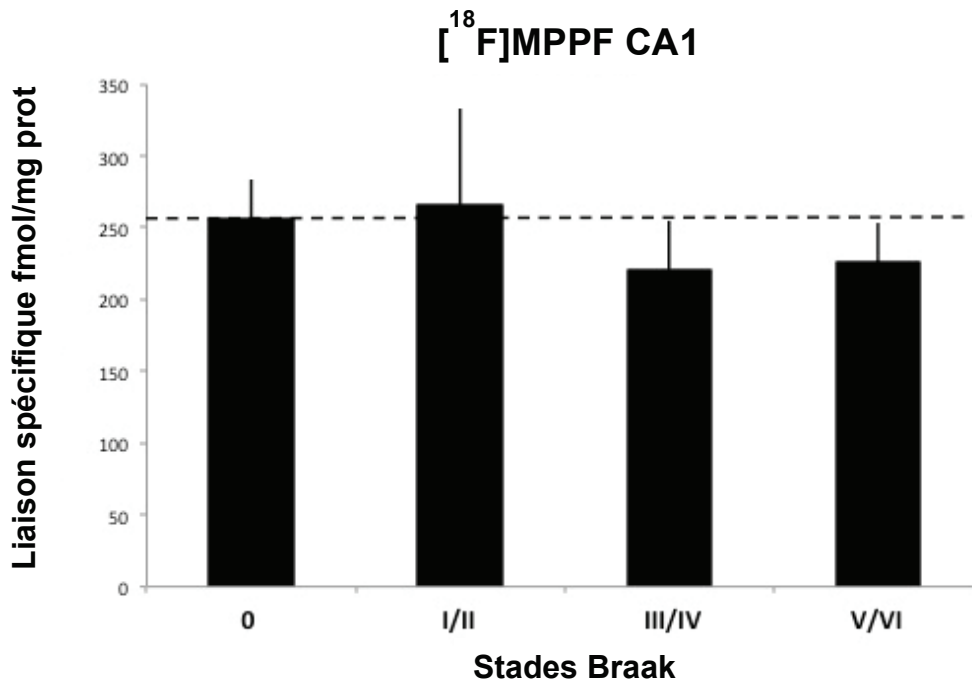
(b) Fixation des radiotraceurs dans la région CA1

Les valeurs quantitatives moyennes de fixation spécifique du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, dans la sous-région CA1, étaient de  $255.5 \pm 28.1$  fmol/mg de protéines pour les patients du groupe contrôle ( $n = 4$ ), de  $265.4 \pm 67.4$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II ( $n = 4$ ), de  $220.8 \pm 34.2$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV ( $n = 4$ ) et de  $225.3 \pm 27.5$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI ( $n = 6$ ). Aucune différence significative, dans l'intensité de marquage, n'a été mise en évidence entre les différents groupes ( $p > 0,05$ , test de Mann-Whitney) (Figure 37).

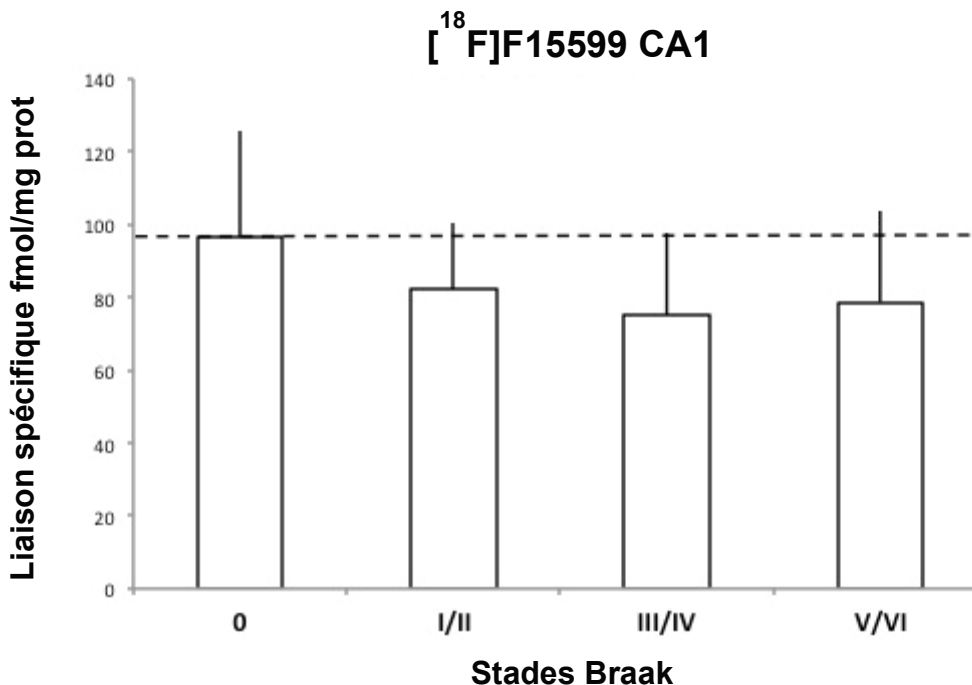
Pour le [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, les valeurs quantitatives moyennes de fixation spécifique, au niveau de la partie CA1, étaient de  $96.4 \pm 29.3$  fmol/mg de protéines pour le groupe



contrôle (n = 4), de  $82.1 \pm 18.6$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II (n = 4), de  $75.2 \pm 22.3$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV (n = 4) et de  $78.7 \pm 25.2$  fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI (n = 6). Aucune différence significative, dans l'intensité de marquage, n'a été mise en évidence entre les différents groupes ( $p > 0.05$ , test de Mann-Whitney) (Figure 38).



**Figure 37 :** Histogrammes des valeurs quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF dans la région CA1, pour chaque groupe de patients (fmol/mg de protéines ± SEM ; p>0.05, test de Mann-Whitney).

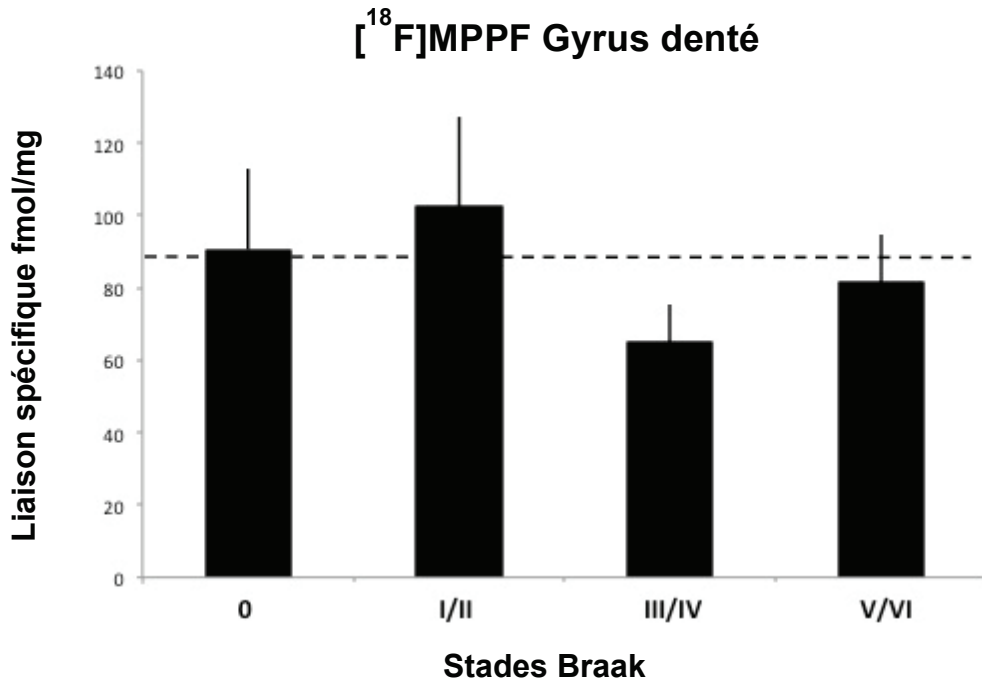


**Figure 38 :** Histogrammes des valeurs quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 dans la région CA1, pour chaque groupe de patients (fmol/mg de protéines ± SEM ; p>0.05, test de Mann-Whitney).

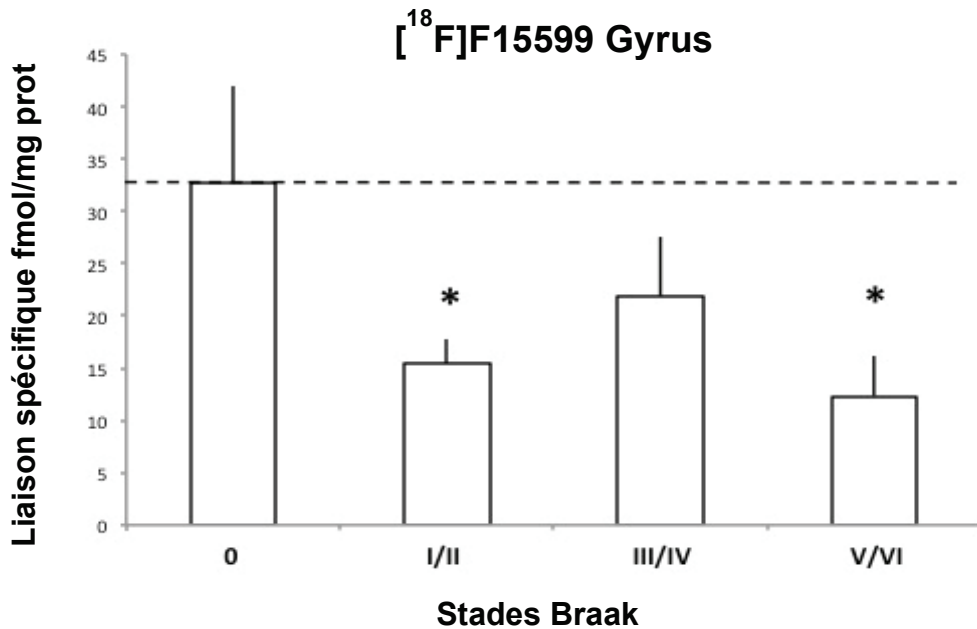
*(c) Fixation des radiotraceurs dans le gyrus denté*

Les valeurs quantitatives moyennes de fixation spécifique du [<sup>18</sup>F]MPPF, dans le gyrus denté, étaient de 90.6 ± 22.5 fmol/mg de protéines pour les patients du groupe contrôle (n = 4), de 102.3 ± 25.2 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II (n = 4), de 64.9 ± 10.4 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV (n = 4) et de 81.5 ± 13.0 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI (n = 6). Aucune différence significative, dans l'intensité de marquage, n'a été mise en évidence entre les différents groupes (p>0.05, test de Mann-Whitney) (Figure 39).

Pour le [<sup>18</sup>F]F15599, les valeurs quantitatives moyennes de fixation spécifique, au niveau de la partie CA1, étaient de 32.7 ± 9.3 fmol/mg de protéines pour le groupe contrôle (n = 4), de 15.5 ± 2.3 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak I/II (n = 4), de 21.9 ± 5.7 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak III/IV (n = 4) et de 11.5 ± 3.2 fmol/mg de protéines pour le groupe Braak V/VI (n = 6). Des différences significatives, dans l'intensité de marquage, ont été mises en évidence entre le groupe contrôle et le groupe Braak I/II (p = 0.029, test de Mann-Whitney) d'une part, et entre le groupe contrôle et le groupe Braak V/VI (p = 0.011, test de Mann-Whitney) (Figure 40).



**Figure 39 :** Histogrammes des valeurs quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF dans le gyrus denté, pour chaque groupe de patients (fmol/mg de protéines ± SEM ;  $p > 0.05$ , test de Mann-Whitney).



**Figure 40 :** Histogrammes des valeurs quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 dans le gyrus denté, pour chaque groupe de patients (fmol/mg de protéines ± SEM ; \* signifie  $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney).

## 5. Discussion

### Concept de l'imagerie des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> fonctionnels

Il est généralement admis que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), dont font partie les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, existent sous deux formes différentes : une forme de haute affinité, pour laquelle le récepteur est couplé à sa protéine G, et une forme de basse affinité, où le récepteur n'est pas couplé à la protéine G correspondante (Clawges, et al., 1997 ; Emerit, et al., 1990). Les protéines G sont le pivot moléculaire de la transduction du signal pour cette grande famille de récepteurs, dont le mécanisme d'activation implique un changement de conformation qui résulte de la fixation d'un agoniste sur le récepteur (Kobilka, 1992). Ainsi, les protéines G apparaissent comme un élément central dans la fonctionnalité des RCPG. Il est reconnu aujourd'hui que les antagonistes, comme le [<sup>18</sup>F]MPPF, se fixent sur les deux populations de RCPG, sans distinction et avec la même affinité (pour revue Aznavour et Zimmer, 2007 ; Gozlan, et al., 1995). En revanche, les agonistes, tels que le [<sup>18</sup>F]F15599, se lient préférentiellement aux récepteurs à haute affinité, couplés aux protéines G. Ces agents pharmacologiques agonistes permettent par conséquent une mesure des récepteurs fonctionnels (Lemoine, et al., 2010 ; Watson, et al., 2000).

Nous avons réalisé, pour la première fois, une étude comparative d'hippocampes de patients Alzheimer, par autoradiographie quantitative *in vitro*, au moyen de deux radioligands TEP : le [<sup>18</sup>F]MPPF, antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, et le [<sup>18</sup>F]F15599, agoniste des mêmes récepteurs.

Le premier objectif de notre étude est de confirmer la pertinence de l'utilisation d'un radiotracer agoniste pour cibler les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> fonctionnels, dans des conditions *in vitro* et sur des prélèvements humains *post mortem*. Les résultats obtenus valident le concept de ciblage des récepteurs fonctionnels par le [<sup>18</sup>F]F15599 sur du tissu cérébral humain. En effet, l'utilisation du Gpp(NH)p, analogue non hydrolysable du GTP qui supprime le couplage entre le récepteur et sa protéine G, provoque une diminution sensible du marquage au [<sup>18</sup>F]F15599. Ceci prouve que la perte de fonctionnalité du récepteur va de pair avec une diminution drastique du marquage au [<sup>18</sup>F]F15599 dont les valeurs résiduelles approchent celles du marquage non spécifique.

## **Evolution de la fonctionnalité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours de la maladie d'Alzheimer**

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'évolution du couplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> lors de la progression de la MA. Notre étude a mis en évidence une diminution significative de la fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 dans le gyrus denté des patients Alzheimer et cela dès les premiers stades de la maladie selon l'échelle de Braak (Braak et Braak, 1991, 1997). Il est intéressant de noter que cette diminution du marquage au [<sup>18</sup>F]F15599, qui reflète les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> fonctionnels, est strictement restreinte au gyrus denté. En ce qui concerne la partie CA1, bien qu'une tendance à la diminution du marquage au [<sup>18</sup>F]F15599 soit observée, celle-ci n'est pas significative. Il ne peut pas être exclu que cette absence de significativité dans la région CA1 soit imputable au faible effectif de notre étude. Cependant il est remarquable que la région du gyrus denté semble plus précocement touchée par la MA que les autres régions de l'hippocampe. En effet, la perte neuronale semble atteindre en priorité le gyrus denté avant de s'étendre à l'aire CA1 (Simic, et al., 1997). De plus, le modèle d'injection intra-hippocampique de peptide β-amyloïde chez le rat a montré une surexpression transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans le gyrus denté uniquement (Verdurand, et al., 2011).

La perte neuronale, lésion caractéristique de la MA, ne peut expliquer à elle seule la diminution de la fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 puisque le marquage au [<sup>18</sup>F]MPPF n'est pas significativement modifié. Si la diminution du nombre de corps cellulaire portant les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> était responsable de la baisse du marquage au [<sup>18</sup>F]F15599, une telle diminution aurait été retrouvée pour le [<sup>18</sup>F]MPPF.

Les études menées en TEP *in vivo* au [<sup>18</sup>F]MPPF, chez des patients Alzheimer et des patients aMCI, ont révélé une augmentation du potentiel de liaison (BP pour « binding potential ») chez les patients MCI (Truchot, et al., 2008 ; Truchot, et al., 2007), alors qu'aux stades avancés de la MA, les patients présentaient une nette diminution de ce BP (Kepe, et al., 2006 ; Truchot, et al., 2008 ; Truchot, et al., 2007). Notre étude *in vitro* n'a pas réussi à reproduire ces résultats *in vivo* puisque la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF ne varie pas significativement entre les groupes, bien qu'une tendance à l'augmentation du marquage au [<sup>18</sup>F]MPPF soit présente aux stades précoces Braak I/II. A l'opposé, le marquage a tendance à diminuer aux stades évolués de la maladie (Braak V/VI).

Ainsi, notre étude a montré que, dans nos conditions expérimentales, le marquage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> totaux par le radioligand [<sup>18</sup>F]MPPF ne varie pas significativement au

cours de la MA. En revanche, le marquage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> fonctionnels par le [<sup>18</sup>F]F15599 diminue significativement dès les premiers stades de la MA. Ceci suggère une perte précoce de fonctionnalité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours de la MA.

Bien que l'ensemble de ces résultats soit à relativiser, par rapport au faible effectif de notre étude, la perte de fonctionnalité mise en évidence ici ouvre de nouvelles perspectives sur les thérapies à visées 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA. En effet, plusieurs équipes soulignent l'intérêt des antagonistes 5-HT<sub>1A</sub> pour restaurer les niveaux de neurotransmissions glutamatergiques et cholinergiques (Bliss et Collingridge, 1993 ; Harder, et al., 1996 ; Harder et Ridley, 2000). Une stratégie utilisant des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> est aussi envisagée par certaines équipes dans le but de traiter les symptômes comportementaux de la maladie (BPSD) (Depoortere, et al., 2010 ; Sato, et al., 2007). Cependant, de telles stratégies, visant les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, supposent une fonctionnalité intacte de ces récepteurs et donc un couplage effectif à leur protéine G. La perte de couplage démontrée dans notre étude pourrait être un élément d'explication de l'absence de résultat probant des démarches thérapeutiques visant les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

Cette étude fait état de résultats préliminaires qui demandent à être confirmés pour valider leur interprétation. En effet, un certain nombre d'éléments viennent limiter la portée de ces résultats.

### **Les limites de l'étude**

La limite principale de notre étude tient au faible nombre de patients dont les échantillons de cerveaux ont pu être récoltés. Notamment, le faible nombre de patients du groupe contrôle réduit le seuil de significativité de notre étude. Ce biais pourrait expliquer l'absence d'une diminution significative du marquage au [<sup>18</sup>F]15599 du groupe Braak III/IV par rapport à celui du groupe contrôle, alors qu'une telle diminution a été observée pour les groupes Braak I/II et V/VI. De plus, une étude rétrospective comme la nôtre devrait comporter, dans l'idéal, un appariement en terme de sex-ratio et d'âge entre les différents groupes. Notre échantillon de patients montre une différence notable de l'âge moyen entre le groupe contrôle et le groupe Braak V/VI. Un tel biais mériterait d'être analysé sur une cohorte plus importante de patients en intégrant l'âge comme une variable dans le traitement statistique. Cependant, la présence de ce biais de recrutement entre les groupes d'une étude sur la MA n'est pas inattendue, étant donné

que l'âge constitue un facteur de risque majeur de la MA (Blacker, et al., 1997 ; Burnham, et al., 2013 ; Johnström et Davenport, 2005). De plus, le groupe qui possède l'âge moyen le plus élevé est celui qui regroupe les patients de stade Braak V et VI, c'est à dire les stades les plus évolués de la maladie. Ainsi, il n'est pas surprenant que les patients les plus avancés dans la maladie aient un âge moyen supérieur aux autres groupes de l'étude.

Le deuxième point de discussion majeur de notre étude tient au choix de l'échelle de Braak pour le regroupement des patients. En effet, le modèle d'augmentation transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> chez le rat, mis au point par Verdurand et coll. (2011) suppose une sensibilité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aux peptides  $\beta$ -amyloïdes. Or, l'échelle de Braak classe les patients selon la progression de la pathologie tau et la sévérité de l'atteinte des aires cérébrales concernées. Elle n'apporte pas d'information sur la charge amyloïde des patients. De plus, l'étude clinique menée par Truchot et coll. a recruté des patients selon des critères cliniques, permettant de distinguer les patients MCI des patients Alzheimer. Cependant, il semble que les anomalies du cytosquelette apparaissent avant les dépôts amyloïdes (Braak, et al., 1994), bien que chez les patients aux stades précliniques de la maladie, les deux types d'anomalies (dépôts amyloïdes et protéine tau sous forme de PHF) soient retrouvées (Delacourte, et al., 1999). La même étude montre, en outre, que la présence de tau-PHF dans les lobes temporaux médian et inférieur corrèle avec les signes présymptomatiques de la maladie. De la même façon, il est remarquable qu'une forte corrélation ait été établie entre la présence de DNF dans l'hippocampe et l'existence de troubles mnésiques établis cliniquement (Nagy, et al., 1996). Toutes ces raisons nous ont amené à utiliser l'échelle de Braak pour grouper nos patients, étant donné que celle-ci permet une hiérarchisation précise des lésions neurofibrillaires, qui progressent de façon séquentielle et stéréotypée. A contrario, la pathologie amyloïde démarre par des dépôts diffus de peptides  $\beta$ -amyloïde, et suit une progression hétérogène quant à la distribution des lésions dans les aires corticales. Ceci rend difficile une classification standardisée des patients selon leur charge amyloïde.

Enfin, il faut souligner les précautions nécessaires quant à l'extrapolation de nos résultats, obtenus dans des conditions *post mortem*, sur des patients Alzheimer encore vivants. En effet, nos conditions expérimentales *in vitro*, le pH et la composition en électrolytes du tampon d'autoradiographie notamment, sont susceptibles de modifier l'équilibre dynamique du couplage entre les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et les protéines G. Ainsi,



nos résultats ne préjugent pas de la proportion de récepteurs couplés dans des conditions *in vivo*, du vivant des patients. Seule une étude d'imagerie TEP *in vivo* avec les mêmes radiopharmaceutiques nous permettrait d'accéder à ces informations, essentielles à la compréhension de l'implication des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA.

### **Les perspectives de l'étude**

Nous proposons que l'usage d'un agoniste 5-HT<sub>1A</sub> en TEP, tel que le [<sup>18</sup>F]15599, pourrait être un outil d'exploration précoce de la MA. Cependant, cet outil nécessite une validation sur un échantillon plus large de patients et des études complémentaires, tant *in vitro* que *in vivo*.

En effet, les résultats présentés ici nous encouragent à poursuivre les études *in vitro* sur une cohorte étendue de patients et avec plus de coupes hippocampiques par patients. Dans un premier temps, il s'agira de réaliser des expériences autoradiographiques, utilisant les mêmes radiotraceurs, dans les conditions nécessaires pour tracer des droites de Scatchard (Johnström et Davenport, 2005). Par cette méthode, nous pourrions déterminer les constantes pharmacologiques pour chaque radioligand : le B<sub>max</sub>, qui représente la densité de récepteurs (en fmol/mg de protéine) et le K<sub>d</sub> (constante de dissociation, concentration exprimée en nM) qui quantifie l'affinité du ligand pour le récepteur. La connaissance de ces constantes nous permettra de préciser les conditions de découplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au cours de la MA. Nous pourrions déterminer si la baisse de fixation du [<sup>18</sup>F]15599, observée dans l'étude présente, est due à une diminution de l'expression des récepteurs, ou à une modification de l'affinité entre le radioligand et le récepteur.

Dans un deuxième temps, nous envisageons de poursuivre nos investigations par un protocole d'imagerie TEP sur des patients Alzheimer en suivi longitudinal, dans le but de comparer le comportement *in vivo* des radiotraceurs [<sup>18</sup>F]MPPF et [<sup>18</sup>F]15599. Chaque sujet aurait un double examen TEP : le premier avec l'antagoniste et le second avec l'agoniste. Ce protocole *in vivo* est indispensable à l'établissement de la preuve de concept de notre hypothèse.

Pour finir, afin de valider notre radiopharmaceutique agoniste comme biomarqueur spécifique de la MA, il serait intéressant de comparer son comportement *in vivo* entre des patients Alzheimer et des patients souffrant d'autres démences séniles neurodégénératives telles que les DCL ou les DFT. En effet, cette étape de validation

paraît importante pour tester la spécificité de notre biomarqueur. De plus, il serait pertinent de tester la corrélation entre le profil de fixation du [<sup>18</sup>F]15599 chez les patients Alzheimer et le profil des marqueurs biochimiques du LCR, les protéines tau et p-tau et les peptides β-amyloïdes.

*Ce travail fait l'objet d'une publication : " Becker G, Streichenberger N, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L (2013). A post-mortem study to compare agonist and antagonist 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in Alzheimer's disease: Toward a new concept in PET imaging. Neurobiology of aging (soumis) ".*

## **B. Pattern d'activation des agonistes 5-HT<sub>1A</sub>**

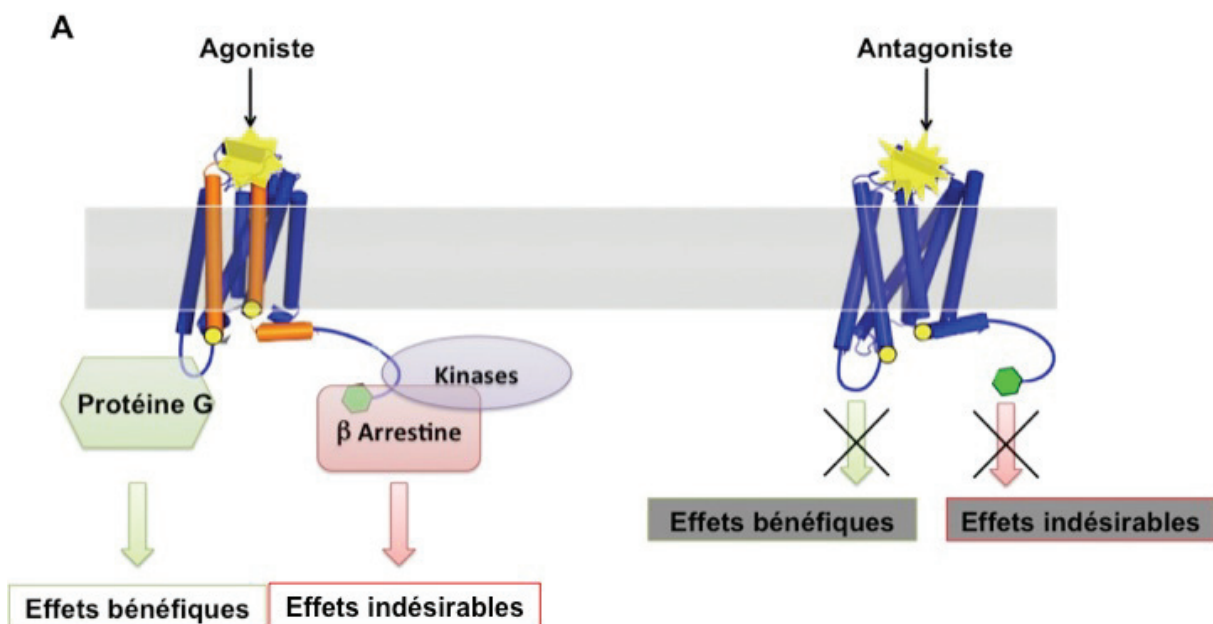
### **1. Rationnel**

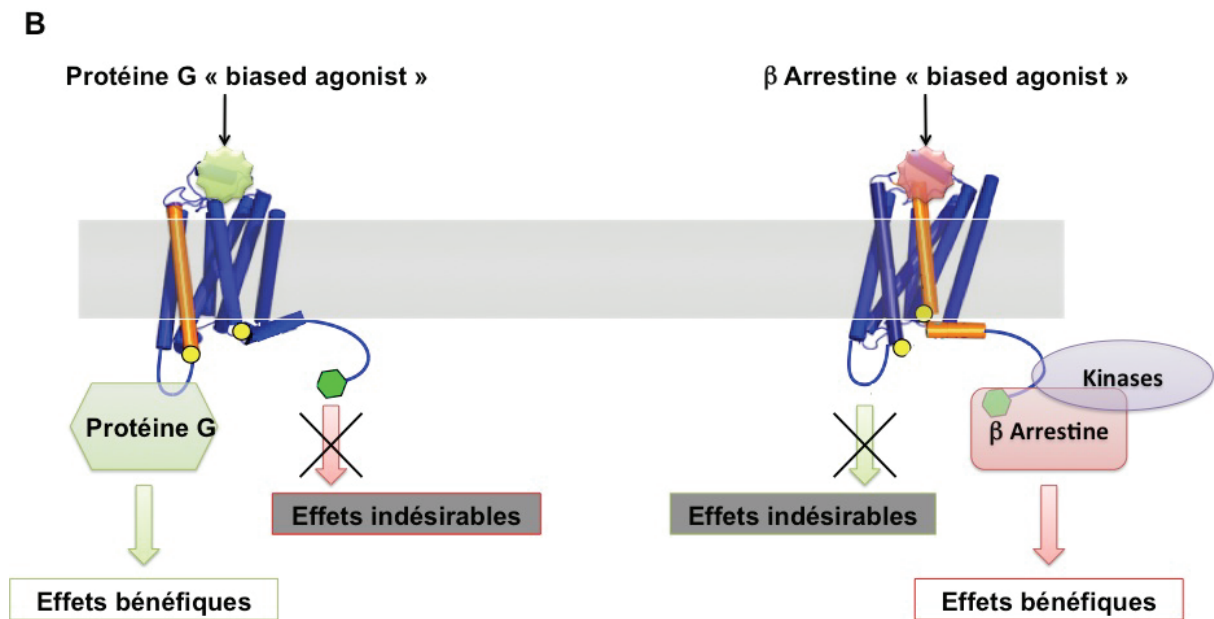
Il a déjà été rappelé dans ce mémoire, l'étendue des projections sérotoninergiques dans l'ensemble du SNC, notamment les projections ascendantes qui innervent une large part des aires corticales (Charnay et Leger, 2010). Donc le réseau sérotoninergique influence fortement les fonctions corticales, et au sein de ce réseau, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques. La distribution subcellulaire de ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> les répartie entre autorécepteurs, localisés sur les somas et dendrites des neurones des noyaux du raphé, et hétérorécepteurs situés sur des neurones non producteurs de 5-HT distribués dans les aires de projections (pour revue Hoyer, et al., 2002).

Un exemple de l'importance de ces récepteurs est leur rôle dans la physiopathologie et le traitement de la dépression (Richardson-Jones, et al., 2010). Il est généralement admis que la stimulation des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par la 5-HT, ou par les agonistes 5-HT<sub>1A</sub>, diminue les décharges des neurones producteurs de 5-HT des noyaux du raphé. Ceci a pour conséquence la baisse de libération de 5-HT dans les terminaisons nerveuses. Cette baisse de 5-HT semble responsable du délai d'action des antidépresseurs inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (ISRS) qui constituent la première ligne thérapeutique de la dépression (Blier et Ward, 2003). C'est pourquoi certaines équipes ont essayé une stratégie thérapeutique associant les ISRS et un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Martinez, et al., 2000). Une autre stratégie a consisté à utiliser la capacité des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> à désensibiliser les autorécepteurs des noyaux du raphé. Ainsi, la vilazodone, qui associe les caractères d'agoniste partiel 5-HT<sub>1A</sub> et d'ISRS possède une action antidépressive. Elle est actuellement utilisée aux Etats-Unis (pour revue Lacivita, et al., 2012). Cependant, si les agonistes 5-HT<sub>1A</sub> semblent avoir des effets bénéfiques dans le traitement de la dépression, par action sur les récepteurs corticaux (Blier et Ward, 2003), ils sont responsables d'effets indésirables, cognitifs et mnésiques, par inhibition des neurones hippocampiques pyramidaux (pour revue Bliss et Collingridge, 1993).

Ces données ont poussé la communauté scientifique à mettre au point des molécules capables de cibler préférentiellement les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> localisés au niveau cortical afin d'éviter les effets indésirables induits par stimulation des récepteurs situés ailleurs dans le cerveau. Ce concept, connu aujourd'hui sous le terme de « biased agoniste »,

n'est pas restreint aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, mais s'applique à l'ensemble des récepteurs qui compose la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembraires (7-RTM) ou récepteurs couplés aux protéines G (RCP-G). En effet, à l'instar des récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines G, les récepteurs de la famille des RCP-G ont plusieurs voies de transduction et messagers secondaires. Il semble que les 7-RTM adoptent une conformation propre à chaque voie de transduction, cette conformation influençant le comportement du récepteur vis-à-vis des ligands (pour revue Kenakin, 2012). En l'occurrence, les 7-RTM possèdent, à côté des protéines G, une autre voie de transduction, les protéines kinases des RCPG associées à la  $\beta$ -arrestine (Lefkowitz et Shenoy, 2005). De nombreuses études ont montré la capacité qu'ont certains ligands de cibler préférentiellement une voie de transduction plutôt qu'une autre (pour revue Reiter, et al., 2012). Ainsi, la pharmacologie moderne s'attache à mettre au point des nouveaux ligands « biased agonists » permettant, par la spécificité de leur voie de transduction, d'éviter les effets indésirables, tout en conservant les effets bénéfiques de leur action (Figure 41).





**Figure 41** : Illustration du changement de paradigme en pharmacologie. **A** approche classique : un agoniste active toutes les voies de signalisation disponibles, alors qu'un antagoniste bloque le récepteur. **B** Approche « biased agonist » : les « biased agonists » active préférentiellement une voie de signalisation liée à un effet thérapeutique ou un effet indésirable.

Les récepteurs sérotoninergiques sont une des cibles sur lesquelles le concept de « biased agonist » pose un regard nouveau (Berg et al, 2008). Pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, nous avons vu précédemment plusieurs éléments qui indiquent que différentes voies de signalisations peuvent coupler ces récepteurs. En ce qui concerne les protéines G, la sous-unité  $\alpha$  varie selon les régions, et si  $\alpha_0$  et  $\alpha_{i3}$ , entre autres, coexistent au niveau cortical,  $\alpha_{i0}$  prédomine dans l'hippocampe et  $\alpha_{i3}$  dans les noyaux du raphé (Mannoury la Cour, et al., 2006). De plus, les ligands agonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ont des affinités différentes selon les sous-unités  $\alpha$  des protéines G qui couplent le récepteur. Notamment, le 8-OH-DPAT montre plus d'affinité pour les 5-HT<sub>1A</sub> couplés à  $G\alpha_{i2}$  qu'à  $G\alpha_{i3}$ , mais dans une moindre proportion que la 5-HT elle-même, et qu'un autre agoniste, l'ipsapirone (Gettys, et al., 1994). Ces résultats sont à relativiser du fait qu'ils ont été obtenus sur culture cellulaire, mais ils montrent bien que la voie de transduction influence l'affinité des agonistes 5-HT<sub>1A</sub>.

Dans ce contexte, les pharmacologues des laboratoires Pierre Fabre ont développé des agonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, dont certains se sont avérés être des « biased agonistes ». Cet axe de développement a aboutit aux deux molécules que nous allons étudier, le F13714 et le F15599.

Le F13714 est un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> qui montre une très grande affinité, avec un Ki de 0.1 nM, et une forte sélectivité pour ces récepteurs, puisque son affinité envers les 5-HT<sub>1A</sub> est 1000 fois supérieur à celle d'autres récepteurs testés (Vacher, et al., 1999). Certaines données suggèrent que le F13714 possède un caractère de « biased agoniste ». Nous avons rappelé en introduction que les autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> inhibent la libération de 5-HT dans les aires de projections. Or, des expériences de microdialyse ont montré que le F13714 provoque rapidement une diminution de la libération de 5-HT hippocampique, puisque l'ED<sub>50</sub> (dose qui permet d'obtenir 50 % de l'effet maximal) est de 0.04 mg/kg, alors que pour les agonistes classique comme la buspirone ou le flesinoxan, cette ED<sub>50</sub> est respectivement de 5.6 mg/kg et 0.77 mg/kg (Assie, et al., 2006). Les auteurs de cette étude montrent qu'une injection aigue F13714 désensibilise les autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Ces résultats ne sont pas retrouvés avec les autres agonistes classiques des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, notamment le 8-OH-DPAT qui nécessite un traitement prolongé pour obtenir le même effet (Casanovas, et al., 1999). De plus, le F13714 discrimine les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> des noyaux du raphé, qui libèrent la 5-HT dans l'hippocampe, alors qu'il n'a que peu d'effet sur les autres récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Cette capacité du F13714 pourrait provenir de sa sélectivité vis-à-vis de la voie de transduction des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritiques des noyaux du raphé (Assie, et al., 2006).

Le F15599 est un autre agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Il est lui aussi très sélectif de ces récepteurs, et montre une grande affinité, avec un Ki de 3 nM (Maurel, et al., 2007). Pour cet agoniste, les données qui caractérisent son profil de « biased agonist » sont bien établies. Tout d'abord, des expériences électrophysiologiques ont montré que le F15599 augmente les décharges des neurones pyramidaux du cortex préfrontal à la dose de 0.2 µg/kg alors qu'il n'agit sur les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, en diminuant leur activité électrique, qu'à la dose de 8 µg/kg (Llado-Pelfort, et al., 2010). De plus, les auteurs de cette étude ont montré, grâce à une sonde de microdialyse implantée dans le cortex préfrontal, que le F15599 provoquait la libération de dopamine avec une ED<sub>50</sub> de 30 µg/kg (intrapéritonéale, i.p.). Or cette action dépend des hétérorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptiques. En revanche, le F15599 ne diminue la libération de 5-HT, qui dépend des autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> présynaptiques des noyaux du raphé, qu'à une ED<sub>50</sub> de 240 µg/kg (Llado-Pelfort, et al., 2010). Ensuite, l'expression du gène précoce c-Fos est induite par le F15599, à la dose de 0.16 mg/kg (i.p.),

préférentiellement dans le cortex frontal (Newman-Tancredi, et al., 2009). Enfin, l'imagerie TEP *in vivo* chez le chat, réalisée à Lyon avec le F15599 marqué au fluor 18 ([<sup>18</sup>F]F15599), a montré une fixation préférentielle dans le cortex cingulaire (Lemoine, et al., 2010). L'ensemble de ces données indique clairement que le F15599, agoniste 5-HT<sub>1A</sub>, possède une sélectivité importante envers les hétérorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptiques corticaux.

## **2. Objectif**

Notre objectif a été de montrer pour la première fois que l'imagerie fonctionnelle peut mettre en évidence l'activation sélective de récepteurs par des « biased agonists », grâce à l'apparition de patterns spécifiques mesurés en IRM fonctionnelle.



### **3. Matériels et méthodes**

Les expérimentations ont été conduites en accord avec le comité français d'éthique animal et selon les directives du conseil de la communauté européenne (86/609/EEC) relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales. Le protocole expérimental a débuté après l'accord du comité local d'éthique animal de l'université Claude Bernard Lyon 1.

#### ***a) Les animaux***

Des rats mâles adultes, de souche Sprague-Dawley (Charles River laboratories, l'Arbresle, France), pesant  $250 \pm 100$  g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils ont été hébergés dans des conditions standardisées de température (22 °C) et d'humidité (50 %). Le cycle jour/nuit a été maintenu à 12h/12h (lumière artificielle de 7h00 à 19h00), l'eau et la nourriture ont été fournies *ad libitum*.

#### ***b) Les procédures animales***

L'anesthésie a été réalisée avec un système approuvé (TEM Segal, Lormont, France). Dans un premier temps, les rats ont été placés dans une boîte d'induction hermétique avec insufflation d'un mélange de gaz isoflurane 4 % d'air contenant 30 % d'oxygène administré à un débit de 1 L/min.

Une procédure de cathétérisation a été effectuée par voie intrapéritonéale afin de procéder à l'injection des agents pharmacologiques. Ainsi, sur chaque rat a été posé un cathéter (20 gauges, Becton Dickinson, NJ, USA) maintenu par ligature à la paroi abdominale. Une tubulure de prolongation a été utilisée afin de procéder aux injections des agents pharmacologiques ou de la solution saline.

Les animaux ont ensuite été placés en décubitus ventral dans un lit en plastique (Bruker Biospec Animal Handling Systems) adapté avec un système de fixation stéréotaxique permettant l'immobilisation de la tête. L'anesthésie a été délivrée via un masque adapté et maintenue à 2 % d'isoflurane pendant toute la durée de l'examen IRM. Ce type d'anesthésie provoquant une hypothermie, la température du corps a été maintenue à  $37 \pm 0.2$  °C par l'intermédiaire d'un circuit d'eau thermo-régulée intégré dans le lit. Un

capteur a été placé sur l'abdomen de l'animal afin de mesurer en permanence la fréquence respiratoire à l'aide d'un dispositif dédié (Trigger ECG Unit RH V.0, Rapid Biomedical, Würzburg, Allemagne).

Dès la fin du protocole, l'anesthésie a été arrêtée et les animaux retirés du système IRM. Ils étaient ensuite placés dans une cage individuelle jusqu'à leur réveil complet. Une fois réveillés et mobiles, les animaux retrouvaient leurs cages collectives dans la pièce qui leur est dédiée à l'animalerie.

### ***c) Agents pharmacologiques***

#### **i. 8-OH-DPAT**

8-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin. Le 8-OH-DPAT est l'agoniste de référence des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Dans notre étude, il a été injecté (i.p.) à la dose de 0.32 mg/kg.

#### **ii. F13714**

3-chloro-4-fluorophenyl-(4-fluoro-4-[[[5-méthyl-6-méthylamino- pyridin-2-ylmethyl]-amino]-methyl]-piperidin-1-yl)-methanone. Le F13714 est un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> initialement développé par les laboratoires Pierre Fabre comme antidépresseur. Dans notre étude, il a été injecté (i.p.) à la dose de 0.04 mg/kg.

#### **iii. F15599**

3 - Chloro - 4 - nitrophenyl - (4 - fluoro - 4 - {[5 - méthylpyrimidin - 2 - ylmethyl] tertbutoxycarbonylamino]-methyl]-piperidin-1-yl)- methanone. Le F15599 est un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> initialement développé par les laboratoires Pierre Fabre comme antidépresseur. Dans notre étude, il a été injecté à la dose de 0.16 mg/kg.

#### **iv. MPPF**

4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2''-pyridin-yl)-p-fluorobenzamido]ethyl]-piperazine. Le MPPF est un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Dans notre étude, il a été injecté à la dose de 0.16 mg/kg.

## **d) Protocole IRM**

### **i. Acquisition des données**

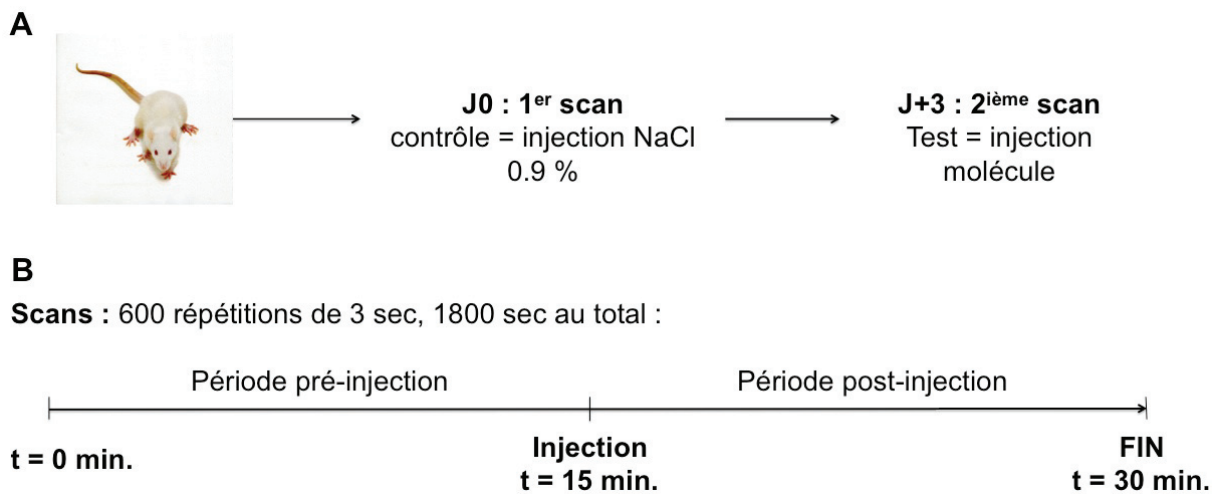
Le protocole d'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été réalisé *in vivo* sur un système Bruker Biospec 7 Tesla (Bruker Biospin GbmH, Allemagne) équipé d'un set de gradients de 400 mT/m d'amplitude et coordonné via une console Bruker. L'interface a été commandée par le logiciel d'acquisition et post-traitement ParaVision5.1. Pour l'émission du signal, une antenne volumique Bruker de type cage d'oiseau (diamètre externe 112 mm, diamètre interne 72 mm) a été utilisée. La réception du signal a été réalisée grâce à une antenne de surface Bruker de type boucle (25 mm de diamètre) qui a été soigneusement centrée sur la tête de l'animal afin de cibler le cerveau.

Après un repérage rapide de la zone d'intérêt, une image anatomique T2 RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) a été obtenue avec les paramètres suivants : temps d'écho (TE) : 69.1 ms, temps de répétition (TR) : 5000 ms, champ de vue : 3.0 x 1.50 cm<sup>2</sup>, matrice : 256 x 128 pixels, résolution spatiale du pixel : 117 μm<sup>2</sup>, facteur RARE : 8, temps d'acquisition : 4 minutes. Dix coupes jointives de 1.50 mm d'épaisseur ont été suffisantes pour couvrir tout le cerveau.

Afin de mesurer des variations du contraste BOLD (Blood-Oxygen-Level-Dependent) une séquence T2\* EPI (Echo Planar Imaging), adaptée à cette mesure, a été utilisée avec les paramètres suivants : TE/TR = 25/3000 ms, matrice : 128 x 64 pixels, résolution spatiale du pixel : 234 μm<sup>2</sup>, nombre de répétitions : 600 pour un temps d'acquisition de 30 minutes. Afin d'obtenir un positionnement identique des 10 coupes de 1.50 mm d'épaisseur et du même champs de vue (3.00 x 1.50 cm<sup>2</sup>) et pour faciliter la définition des régions d'intérêt, la géométrie de la séquence T2 RARE anatomique précédemment acquise a été importée sur la T2\* EPI. Après l'acquisition IRM, les images brutes ont été converties en format DICOM puis en NIfTI et transférées sur une console de traitement pour l'analyse statistique via SPM.

Les animaux ont été répartis dans 4 groupes correspondant aux quatre molécules injectées : 8-OH-DPAT (n = 8), F13714 (n = 9), F15599 (n = 6) et MPPF (n = 6). Le protocole expérimental de pharmacoIRM se déroulait en une acquisition continue de 30 minutes. Cette acquisition était divisée en deux phases : la phase initiale d'acquisition de la ligne de base pendant 15 minutes (période pré-injection), suivie de 15 minutes

d'acquisition après l'injection intrapéritonéale (période post-injection). Les animaux ont été scannés sous deux conditions : une condition contrôle qui consistait en une injection de solution saline (NaCl 0.9 %), et 72 heures après la condition contrôle, chaque animal recevait une des quatre molécules (Figure 42). Les molécules et la solution saline contrôle ont été injectées à un volume de 1 ml/200g de poids corporel. L'injection s'est déroulée sur 30 secondes, après quoi le volume mort restant dans la tubulure était rincée par 0.6 ml de solution saline.

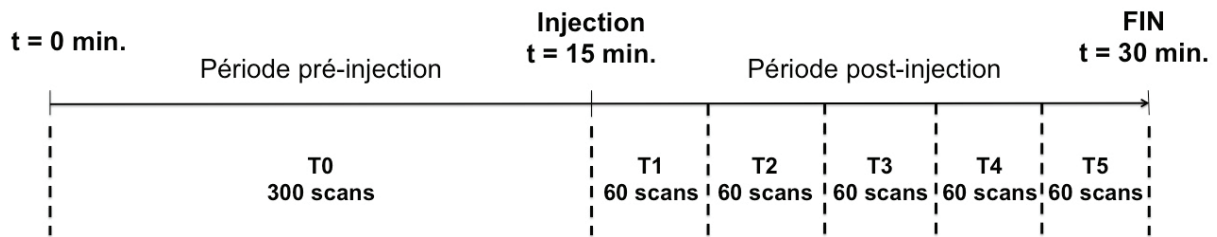


**Figure 42** : Résumé du design de l'étude (A) et du protocole d'acquisition des données (B).

## ii. Analyse statistique

Les données d'imagerie ont été analysées avec le logiciel Statistical Parametric Mapping (SPM8, Friston, The Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK). Les images ont été réalignées pour corriger les mouvements éventuels. Ensuite, les images réalignées ont été normalisées spatialement puis lissées afin de permettre les comparaisons entre les sujets.

L'analyse statistique s'est effectuée en deux étapes successives. Le premier niveau a consisté à mesurer, pour chaque sujet, la différence entre la condition contrôle et l'injection de la molécule correspondant au groupe en question. Pour cela, les séries temporelles (600 scans) ont été divisées en 6 périodes de T0 à T5 (figure 43).



**Figure 43 :** Résumé du découpage en période des 600 scans analysés. T0 (15 minutes) correspond à la période de pré-injection et regroupe les 300 premiers scans qui constituent la ligne de base. Après l'injection, chaque période T1 à T5 (3 minutes chacune) est constituée de 60 scans.

T0 regroupe les 300 scans qui constituent la période de pré-injection qui s'étale sur 15 minutes. Les périodes suivantes durent 3 minutes chacune et contiennent 60 scans, elles vont de T1 à T5. L'injection de la molécule ou de la solution saline contrôle dure 30 secondes, elle correspond donc aux 10 premiers scans de T1.

Pour chaque sujet, les périodes T1 à T5 ont été comparées séparément à T0 par un test  $t$  de Student. De ce premier niveau d'analyse ressortent cinq contrastes ( $T_n - T_0$ ) correspondant à chaque période, et ce pour tous les sujets. Ensuite, un second niveau d'analyse a été réalisé afin de déterminer les voxels activés significativement entre les sujets, à la suite de l'injection des molécules. Pour ce deuxième niveau, nous avons entré dans un test  $t$  - apparié les contrastes issus du premier niveau, après injection contrôle ou molécules testées, et ce, pour chaque période.

Au total, cinq « paired  $t$ -test » calculant le contraste molécule vs contrôle ont été analysés :  $[(T_n - T_0)_{\text{molécule}} - (T_n - T_0)_{\text{contrôle}}]$ . Ils montrent, pour chaque groupe, les aires significativement activées pendant chaque période, de T1 à T5. Le seuil de significativité était fixé à  $p < 0.01$  non corrigé.

## 4. Résultats

### a) Cartes d'activation

#### i. 8-OH-DPAT

le 8-OH-DPAT, injecté à la dose de 0.32 mg/kg i.p., provoque une activation intense, et étendue à l'ensemble du cerveau (Figure 44). L'activation précoce (T1) la plus intense se situe au niveau caudale, à la coordonnée Br (Bregma) – 7.6. Les voxels activés significativement sont dans le subiculum et le post-subiculum, ainsi que certaines aires corticales postérieures et les noyaux profonds mésencéphaliques. Au même moment T1, sur la coupe antérieure jointive Br – 6.30, l'hippocampe est toujours activé dans le subiculum mais aussi dans le gyrus denté (DG), de même que les aires corticales postérieures. A Br – 5.29, l'activation est constante dans le subiculum et la pointe du DG, et apparaît dans le colliculus supérieur. Sur cette coupe apparaît une activation corticale qui restera présente dans toute la moitié antérieure du cerveau. L'hippocampe se termine sur la coupe Br – 1.27 avec la commissure ventrale hippocampique qui est activé. Les coupes antérieures dévoilent les structures striatales. Elles sont activées majoritairement dans la partie ventrale (Br – 0.30). Cette coupe montre aussi une activation corticale, au niveau sagittal et cingulaire. La coupe rostrale Br 0.92 montre l'activation de noyaux ventraux, probablement ceux du pallidum ventral, des îlots de Calleja et du tubercule olfactif. L'activation corticale progresse dorsalement, et les noyaux du septum médian et septo-hippocampiques sont activés. D'un point de vue temporel, l'activation est maximale à T2 dans les parties caudales du cerveau, alors qu'elle continue de s'étendre dans les parties antérieures jusqu'à T5. Sur les deux dernières coupes (Br – 6.30 et – 7.6), l'activation s'étend à tous les colliculi, à la substance grise périaqueducale et à l'ensemble des noyaux mésencéphaliques profonds, ainsi qu'aux parties caudales de l'hippocampe jusqu'au cortex entorhinal. La coupe Br – 5.29 montre une activation qui s'étend dans l'hippocampe et au niveau des aires corticales. Il en est de même à Br – 4.4, avec en plus un envahissement des noyaux thalamiques dorsaux. A partir de la coupe Br – 1.27, il y a un embrasement progressif du striatum, cette coupe montre aussi une activation du cortex cingulaire et des aires somatosensorielles primaires à T5. Sur les coupes Br – 0.30 et Br 0.92, l'activation du striatum suit une progression ventro-dorsale et fini par englober l'ensemble de la

structure. Les aires corticales sont elles aussi toujours activées, ainsi que les noyaux du septum.

ii. F13174

Lorsque le F13714 est injecté à la dose de 0.04 mg/kg i.p., il provoque une activation importante et bien délimitée (Figure 45). Celle-ci est majoritairement restreinte aux parties antérieure et médiane du cerveau. Au moment T1, l'activation majeure est située sur la coupe Br - 1.27, et limitée à la commissure ventrale hippocampique et au fimbriae. Il faut noter quelques voxels activés dans le caudé-putamen. Les coupes adjacentes antérieures et postérieures montrent respectivement une activation dans le striatum dorsal (Br - 0.30), et dans la commissure de l'hippocampe, les noyaux habénulaires médians et les noyaux thalamiques paraventriculaires (Br - 4.4). Lorsque l'on progresse caudalement, l'activation diminue et ne reste présente que dans le post-subiculum. De T2 à T5, l'activation reste sensiblement égale pour les coupes médianes (Br - 4.4 et - 5.29), alors qu'elle progresse sur les coupes caudales (Br - 6.30 et - 7.6). Sur les coupes antérieures, l'activation est à son maximum à T2 pour Br - 1.27 où elle s'étend, à partir de la commissure hippocampique, aux noyaux striataux dorsaux et aux aires amygdaloïdes antérieures. Sur la coupe - 0.30, les noyaux du caudé-putamen dorsaux s'estompent et laissent place aux noyaux ventraux. On aperçoit une activation de certains noyaux corticaux à partir de T3.

iii. F15599

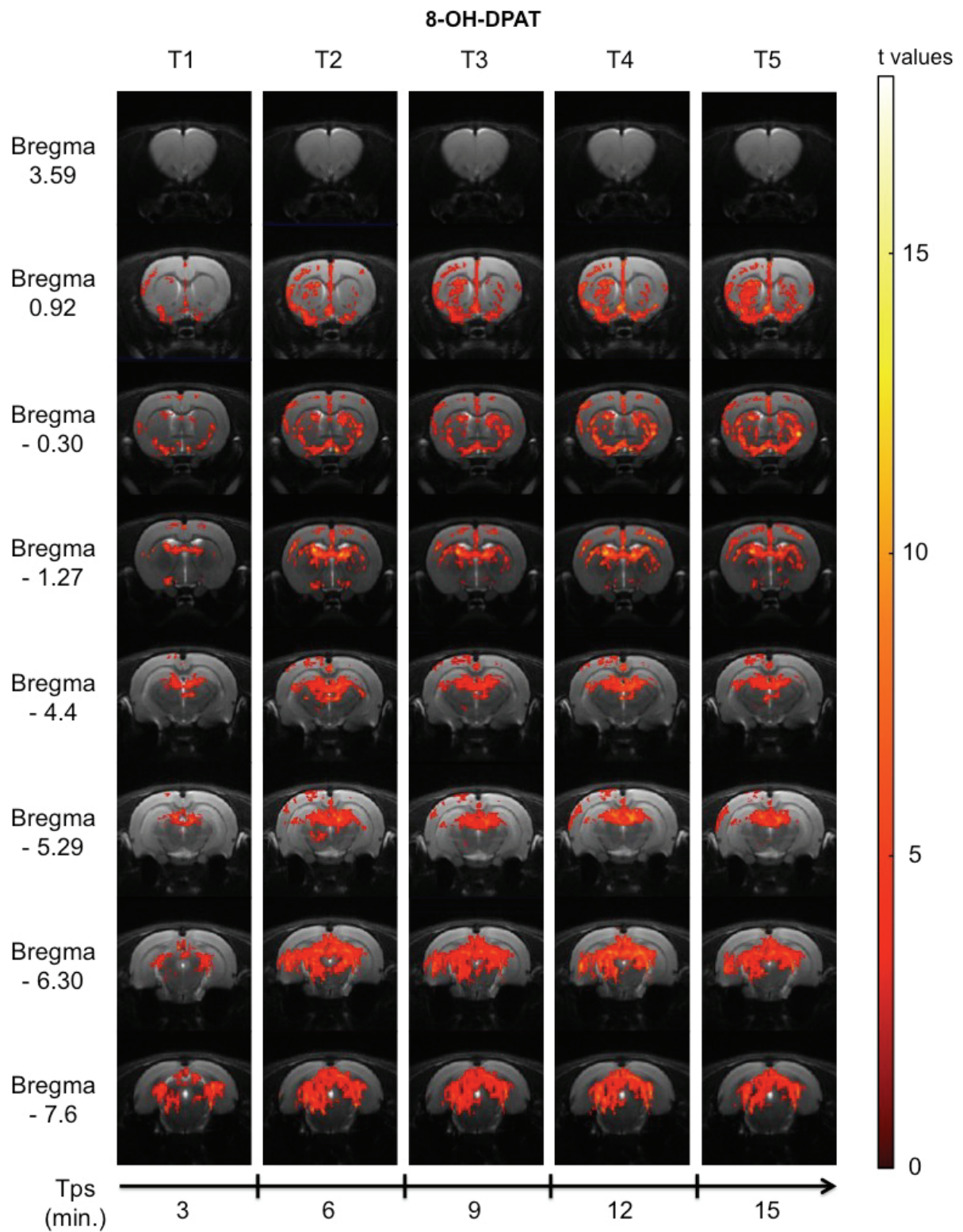
L'injection de F15599 à la dose de 0.16 mg/kg i.p., provoque une activation extrêmement précise et limitée (Figure 46). En effet, sur l'ensemble du cerveau, seul le cortex cingulaire est activé, principalement aux temps T2 et T3, sur l'ensemble des coupes. Le niveau de coupe Br 0.92 montre l'activation la plus intense, et la plus stable dans le temps. Sur ces coupes ressortent, en plus du cortex cingulaire, les noyaux septohippocampiques ainsi que ceux du septum médian, et enfin le cortex sagittal (T5).

iv. MPPF

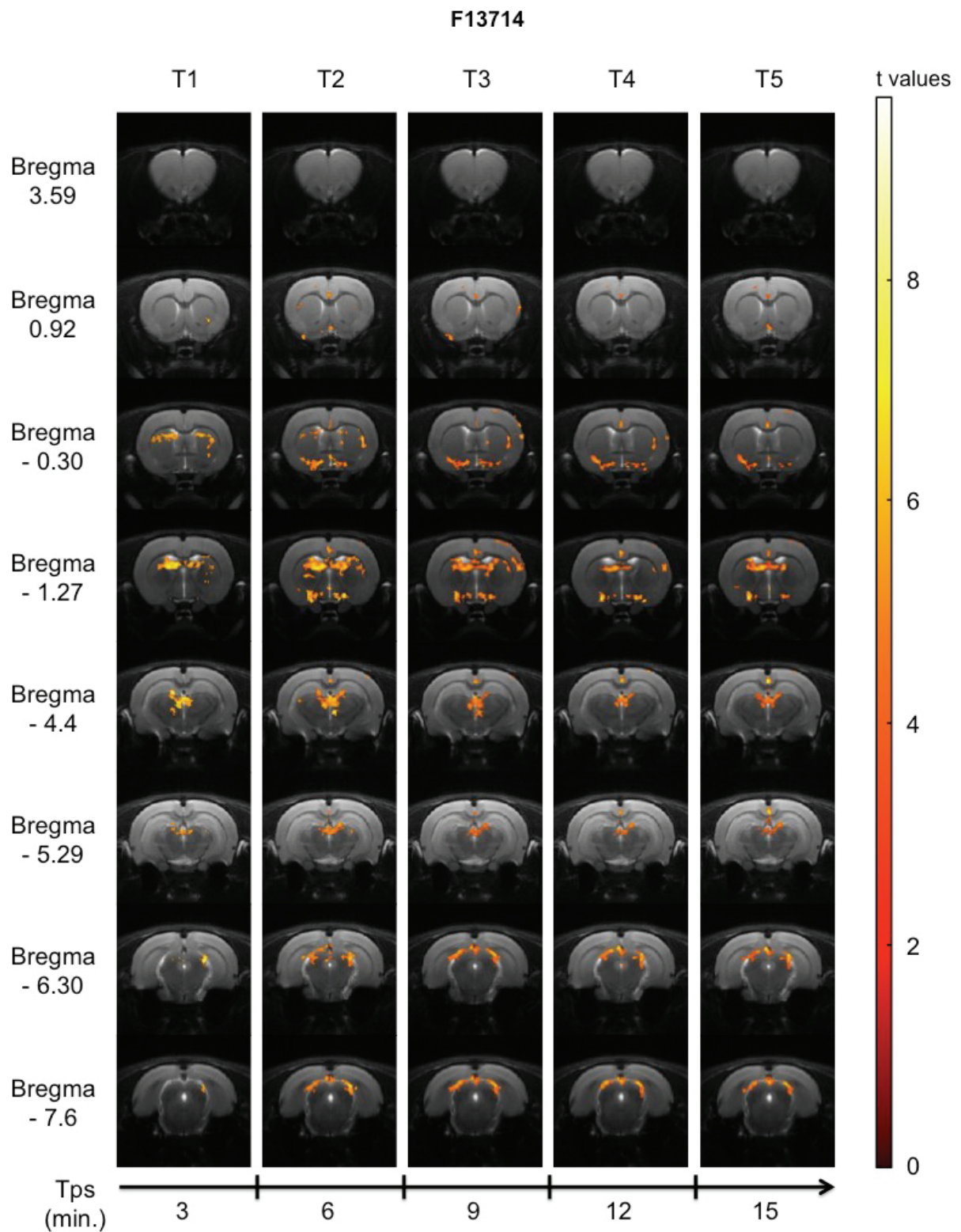
Contrairement à l'injection des agonistes, l'injection de l'antagoniste MPPF, à la dose de 0.16 mg/kg, ne provoque que très peu d'activation (Figure 47). Il y a seulement quelques

voxels activés de T1 à T4, probablement dans le cortex piriforme ou sagittal, sur la coupe Br - 0.30. On note aussi une activation très ponctuelle dans l'hippocampe à T2 (Br - 5.29).

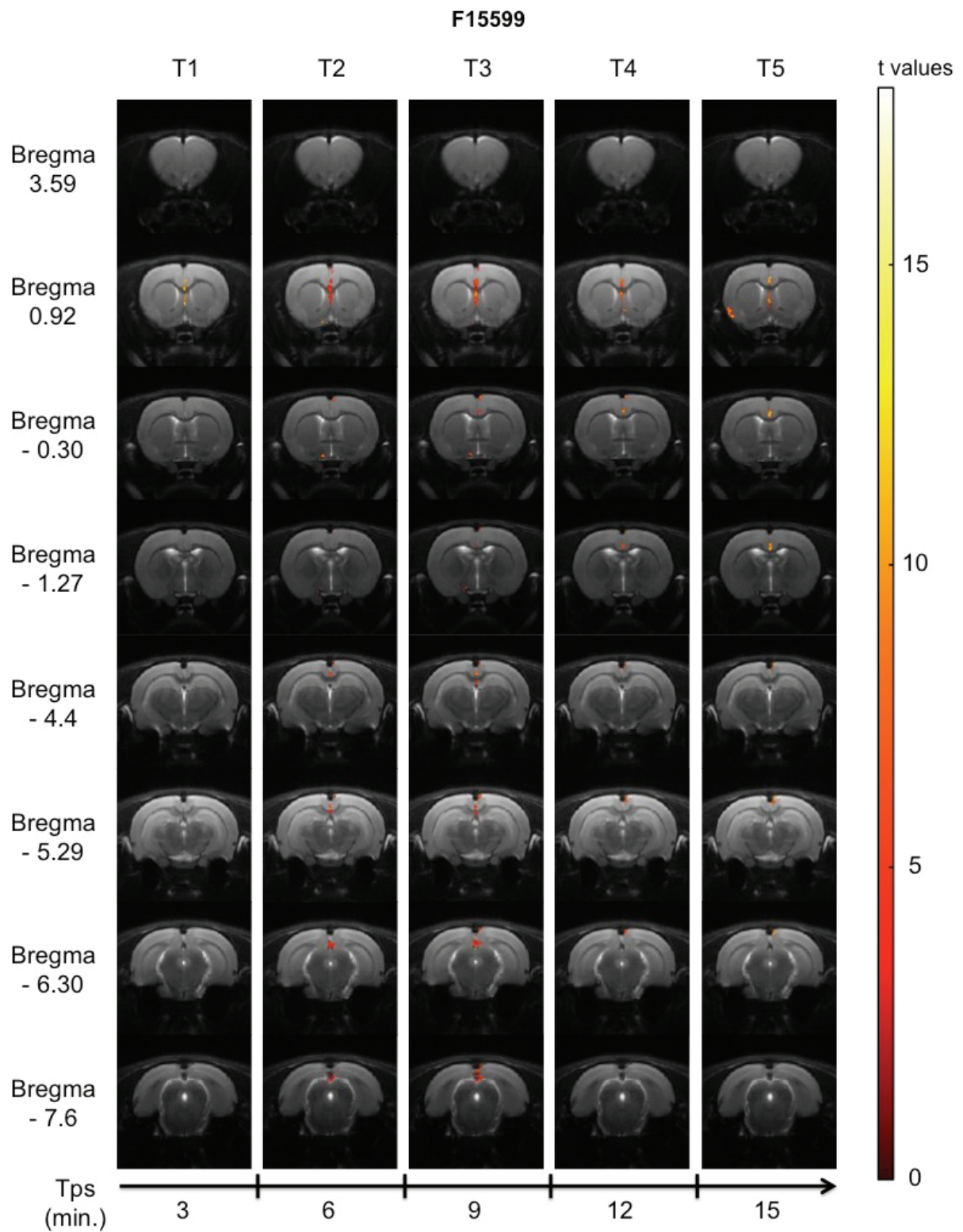




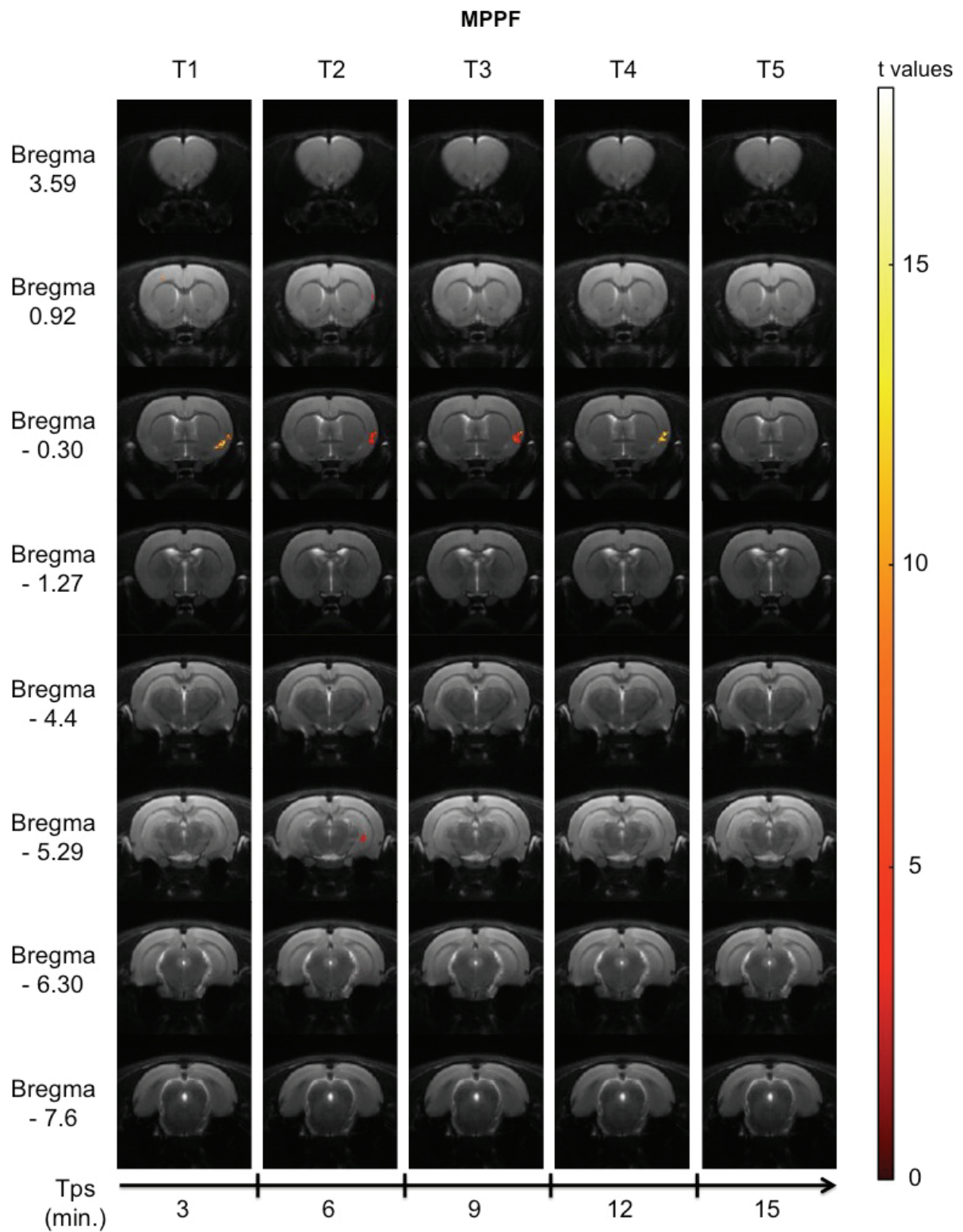
**Figure 44 :** Cartographie des régions cérébrales activées par l'injection de 8-OH-DPAT (0.32 mg/kg). La durée des périodes T1 à T5 est reportée sur l'échelle de temps. L'échelle de droite indique les valeurs du test t - apparié ( $p < 0.01$ ).



**Figure 45 :** Cartographie des régions cérébrales activées par l'injection de F13714 (0.04 mg/kg). La durée des périodes T1 à T5 est reportée sur l'échelle de temps. L'échelle de droite indique les valeurs du test t - apparié ( $p < 0.01$ ).



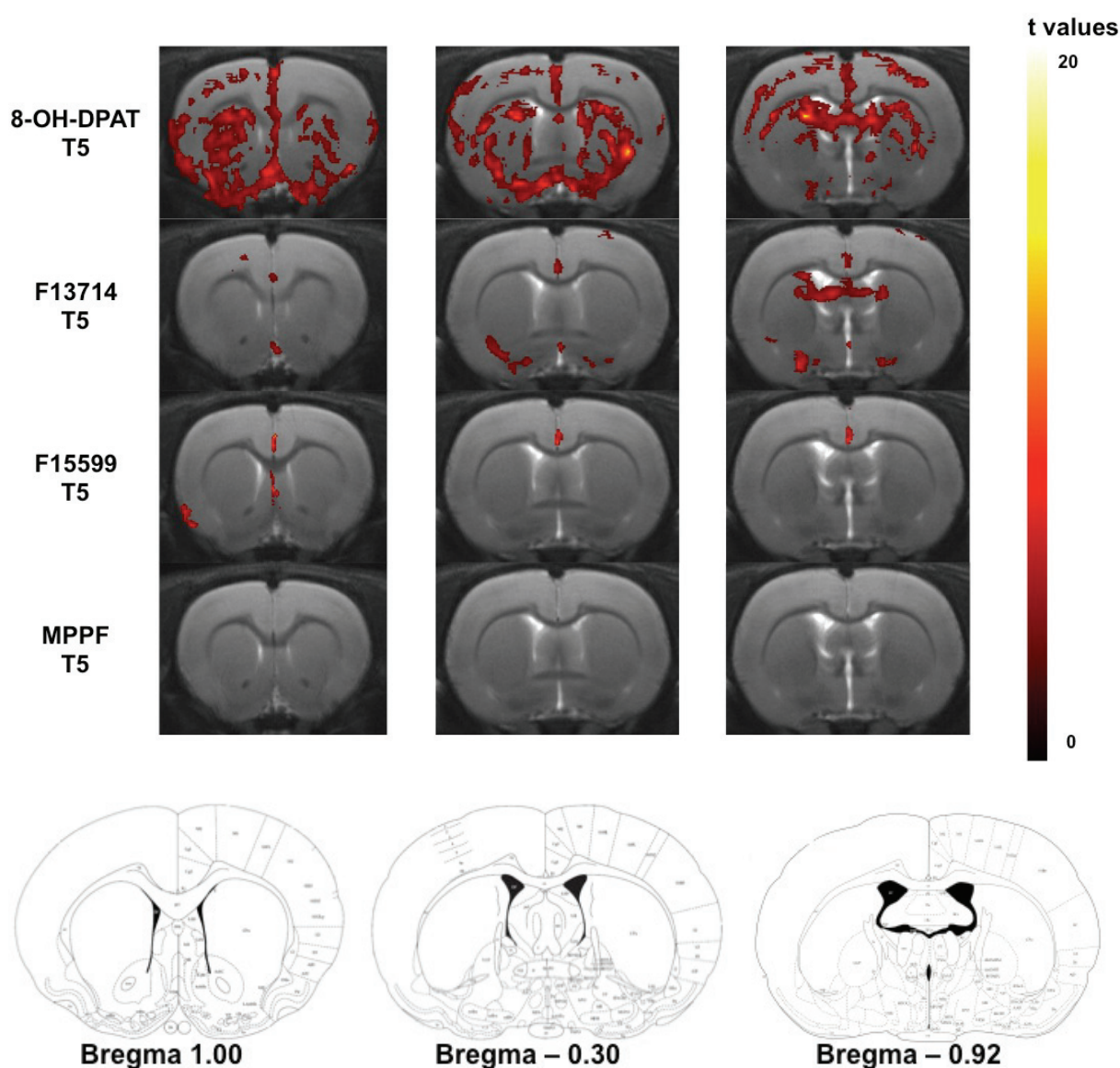
**Figure 46 :** Cartographie des régions cérébrales activées par l'injection de F15599 (0.16 mg/kg). La durée des périodes T1 à T5 est reportée sur l'échelle de temps. L'échelle de droite indique les valeurs du test t - apparié ( $p < 0.01$ ).



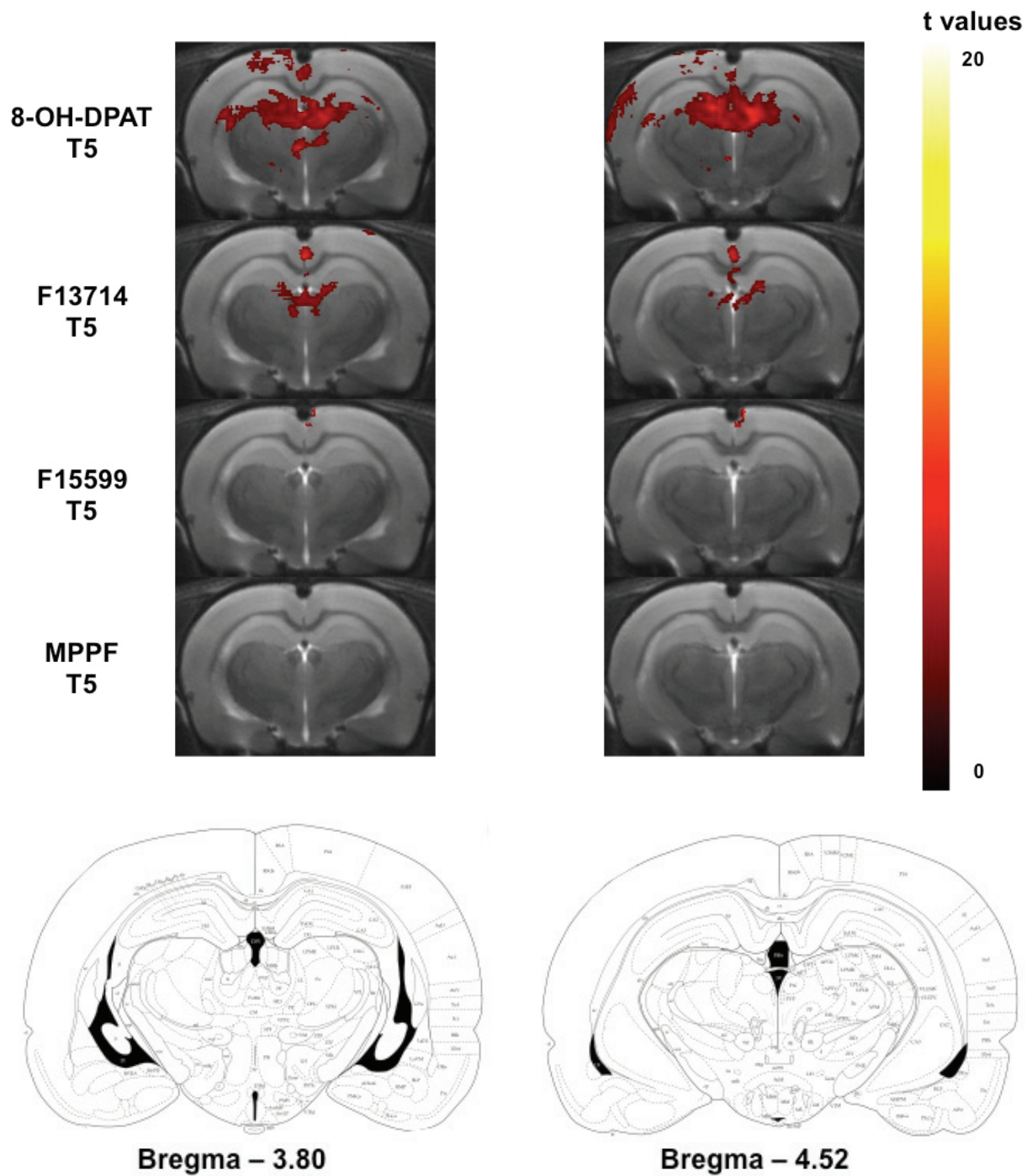
**Figure 47 :** Cartographie des régions cérébrales activées par l'injection de F15599 (0.16 mg/kg). La durée des périodes T1 à T5 est reportée sur l'échelle de temps. L'échelle de droite indique les valeurs du test t - apparié ( $p < 0.01$ ).

### **b) Comparaison de la significativité des tests $t$**

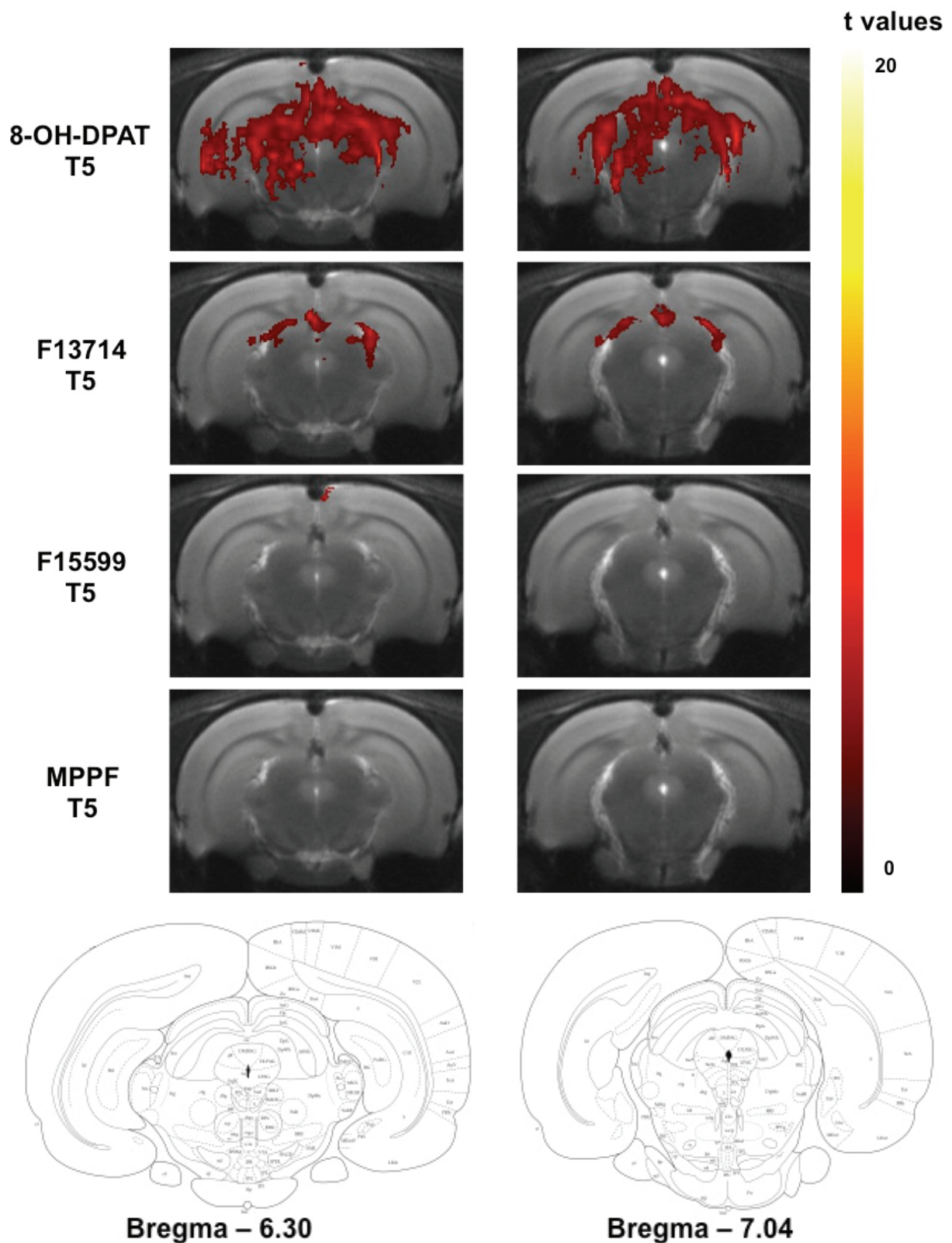
Après avoir normaliser les échelles de significativité des valeurs  $t$  du test  $t$  - apparié pour chacun des groupes, nous pouvons comparer les niveaux de significativité des voxels activés à T5 (Figure 48 à 50). Il ressort que les voxels activés ont globalement tous le même niveau de significativité, avec une valeur  $t$  située entre 6 et 10. Seul quelques voxels, activés par le 8-OH-DPAT et situés dans le striatum, montre une significativité supérieure avec une valeur  $t$  de 18 (Figure 48).



**Figure 48** : Comparaison des régions antérieures du cerveau activées par les différentes molécules, à la période T5. Sous les cartes d'activation sont représentés les atlas correspondant avec leurs coordonnées (Paxinos et Watson, 1986).



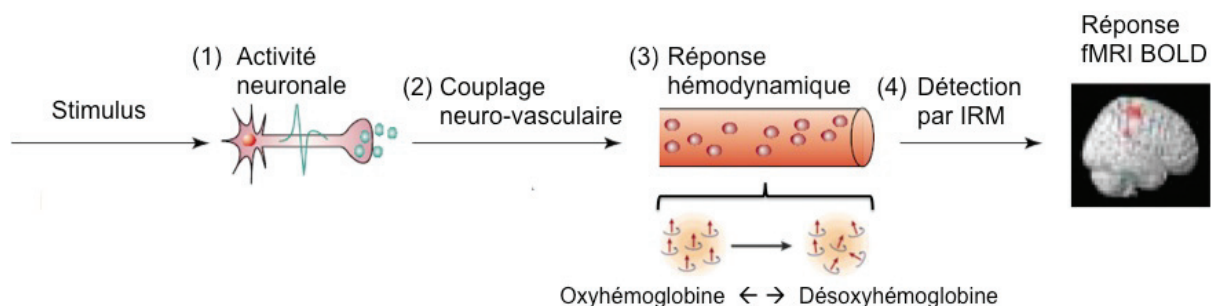
**Figure 49** : Comparaison des régions médianes du cerveau activées par les différentes molécules, à la période T5. Sous les cartes d'activation sont représentés les atlas correspondant avec leurs coordonnées (Paxinos et Watson, 1986).



**Figure 50 :** Comparaison des régions postérieures du cerveau activées par les différentes molécules, à la période T5. Sous les cartes d'activation sont représentés les atlas correspondant avec leurs coordonnées (Paxinos et Watson, 1986).

## 5. Discussion

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est largement utilisée dans le domaine des neurosciences cognitive et sensorielle depuis les années 1990. Un des éléments qui a poussé à son utilisation, notamment clinique chez l'homme, est son caractère non invasif. Cette technique d'imagerie est basée sur un signal appelé BOLD, pour « Blood Oxygen Level Dependent », qui est basé sur la susceptibilité magnétique de la désoxyhémoglobine (contrairement à l'oxyhémoglobine). Cette propriété de réponse paramagnétique de la désoxyhémoglobine placée dans un champ magnétique puissant permet de reconstituer des contrastes d'images spatiotemporelles (pour revue Martin et Sibson, 2008). Ces contrastes permettent de corrélérer les réponses hémodynamiques induites par un changement d'activité neuronale. En effet, il est important de noter que les signaux d'IRMf ne mesurent pas directement l'activité neuronale, mais bien des modifications du flux sanguin cérébral, du volume sanguin cérébral et de la consommation d'oxygène, ces trois composantes étant regroupées sous le terme de fonction de réponse hémodynamique (Figure 51).



**Figure 51** : Schéma résumé de la relation entre la réponse hémodynamique et le signal IRMf BOLD. Le signal BOLD a plusieurs constituants : (1) réponse neuronale à un stimulus. (2) relation entre activité neuronale et réponse hémodynamique, désignée par le terme de couplage neuro-vasculaire. (3) réponse hémodynamique proprement dite. (4) mesure par le système IRM du signal BOLD (d'après Arthurs et Boniface, 2002).

L'IRMf a permis de répondre à de nombreuses questions concernant les réseaux neuronaux impliqués dans les réponses à différents stimuli sensoriels. Il est donc reconnu que les études d'IRMf réalisées chez l'homme, le primate non humain ou d'autres animaux, procurent des indices fiables du changement d'activité neuronale.



Récemment, l'application de cette méthodologie à la neuropharmacologie a été étudiée (Schwarz, et al., 2007). Ce nouveau paradigme est appelé IRM pharmacologique (IRMph). Il est défini comme l'application des techniques d'IRMf à la cartographie des changements cérébraux induits par l'administration d'agents pharmacologiques (pour revue Martin et Sibson, 2008). Il faut porter attention au fait que les actions centrales des drogues peuvent être complexes. Ainsi les changements de signaux observés, et donc reportés sur les images de contrastes IRM, peuvent impliquer à la fois le site d'action primaire du composé et les effets secondaires provoqués dans d'autres aires cérébrales (Schwarz, et al., 2007).

L'IRMph ouvre un vaste champ d'exploration qui a été rapidement exploité. Un certain nombre d'études ont notamment exploré les systèmes de transmission dopaminergique et sérotoninergique (pour revue Martin et Sibson, 2008). En ce qui concerne le système sérotoninergique, les études précliniques chez l'animal sont de plus en plus nombreuses (Bouet, et al., 2011 ; Freo, et al., 1995 ; Mueggler, et al., 2011 ; Scanley, et al., 2001). Quant aux études cliniques commencées il y a une petite dizaine d'années, elles concernent principalement les effets neuronaux induits par la prise d'ISRS, et permettent ainsi une meilleure compréhension de l'intégration du réseau sérotoninergique (Chen, et al., 2011 ; Jovanovic, et al., 2011 ; McKie, et al., 2005). En conclusion, l'IRMph est un outil robuste qui permet de cartographier les régions activées par certains agents pharmacologiques et ce faisant, de faire ressortir d'éventuels profils spécifiques pour ces agents.

### **Considérations méthodologiques**

L'analyse statistique des contrastes obtenus grâce au signal BOLD a une importance majeure car leurs intensités sont relativement faibles et peuvent s'approcher des limites de sensibilité de l'IRM (Ferrari, et al., 2012). Dans cette étude, nous avons opté pour un design permettant à chaque rat d'être son propre contrôle. En effet, la réalisation de deux injections à 3 jours d'intervalle, d'abord une injection placebo (ou contrôle) de sérum physiologique (NaCl 0.9 %) puis une injection d'agents pharmacologiques 5-HT<sub>1A</sub>, nous autorise à comparer pour chaque individu la condition contrôle et la condition test. Nous pouvons alors utiliser au deuxième niveau d'analyse, un test *t* – apparié qui nous permet d'augmenter notre puissance statistique. L'analyse statistique a été faite en deux étapes afin de prendre en compte la variabilité inter-sujet dans un premier temps, puis

d'utiliser la moyenne du groupe au deuxième niveau. La méthode que nous avons utilisée est suffisamment robuste pour avoir été utilisée en clinique chez l'homme (McKie, et al., 2005). De plus, l'utilisation du découpage séquentiel en 6 périodes T0 à T5 nous permet d'avoir une résolution temporelle précise sur les cartes d'activation, et ce pour chaque molécule.

Une question essentielle lors de la mise au point de notre protocole fut la détermination des doses utilisées pour chaque ligand 5-HT<sub>1A</sub>. Plusieurs éléments nous ont conduits à injecter le 8-OH-DPAT à la dose de 0.32 mg/kg. Tout d'abord, le 8-OH-DPAT montre la capacité de moduler le niveau de phosphorylation des protéines pERK 1/2 à la dose de 0.63 mg/kg alors que cet effet est absent à 0.16 mg/kg (Buritova, et al., 2009). Les auteurs ont montré que l'injection, par voie intrapéritonéale, de 0.63 mg/kg de 8-OH-DPAT augmente l'expression de pERK 1/2 dans le cortex préfrontal et l'hypothalamus et la diminue dans l'hippocampe. Ces effets sont aussi retrouvés avec d'autres agonistes 5-HT<sub>1A</sub>, notamment la buspirone. Nous avons déjà rappelé que les protéines pERK 1/2 font parties des voies de signalisation impliquées dans l'action des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Polter et Li, 2010). Or des études *in vitro* ont montré que la quantification de pERK 1/2 offrait une mesure sensible de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par leurs ligands (Cussac, et al., 2002). De plus, une étude comportementale réalisée par une équipe japonaise a montré la capacité du 8-OH-DPAT à altérer les performances mnésiques des rats, dans une tâche de reconnaissance spatiale (Isayama, et al., 2001). Les auteurs montrent que le 8-OH-DPAT réduit les performances de façon significative dès la dose de 0.2 mg/kg, mais celles-ci sont fortement diminuées à la dose de 0.5 mg/kg. Enfin, plusieurs études ont montré que le 8-OH-DPAT possède une action anxiolytique (Carli, et al., 1989). Cet effet anxiolytique, modélisé par des paradigmes comportementaux d'interactions sociales chez le rat, est visible aux doses 0.25 et 0.5 mg/kg (i.p.). En revanche, il ne montre aucun effet à la dose de 0.125 mg/kg (Picazo, et al., 1995). Ainsi, nous avons opté pour la dose de 0.32 mg/kg car elle est au-dessus de la dose minimale efficace, qui semble être autour de 0.25 mg/kg, et elle n'est cependant pas trop élevée pour nous permettre la comparaison avec les autres molécules.

Le F13714 est l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub> utilisé à la plus faible concentration, 0.04 mg/kg. En premier lieu, il convient de rappeler qu'il est un agoniste très affiné, avec un K<sub>i</sub> de 0.1 nM (Vacher, et al., 1999). A titre de comparaison, le 8-OH-DPAT a une affinité maximale

pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> hippocampiques de 2 nM (Hall, et al., 1985). Une étude comportementale nous a conduit à utiliser cette dose pour le F13714. En effet, injecté à 0.04 mg/kg, le F13714 induit des déficits mnésiques chez le rat (Depoortere, et al., 2010). Cette étude a utilisée deux paradigmes expérimentaux modélisant la mémoire de travail et la mémoire de référence, respectivement le test de la planche à trou et une tâche d'apprentissage réversible. Les chercheurs ont provoqué une baisse des performances sur ces tâches par injection de phéncyclidine (PCP, 2.5 mg/kg en sous-cutané), qui est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA. Contrairement à son homologue le F15599, dont nous reparlerons par la suite, le F13714 ne permet pas d'amélioration des performances chez les rats injectés avec la PCP. Mais paradoxalement, le F13714 lorsqu'il est injecté à la dose de 0.04 mg/kg (i.p.), induit par lui-même, une diminution des performances basales chez les rats non traités par la PCP et renforce l'effet délétère de celle-ci. De plus, 0.04 mg/kg est la DE<sub>50</sub> avec laquelle le F13714 diminue la concentration hippocampique de 5-HT (Assie, et al., 2006). Contrairement au F13714, le F15599 montre la capacité de restaurer les fonctions mnésiques chez des rats traités par PCP. Au cours de la même étude, Depoortere *et coll.* ont montré que le F15599 injecté à 0.16 mg/kg permet non seulement de restaurer les performances mnésiques dans les tests de la planche à trou et de mémoire réversible, mais aussi qu'il n'induit aucun trouble mnésique à lui seul (Depoortere, et al., 2010). Ces résultats expérimentaux nous ont convaincus d'utiliser le F15599 à cette dose de 0.16 mg/kg. Nous avons déjà mentionné que à cette dose, le F15599 induit l'expression de c-fos préférentiellement dans le cortex préfrontal et non dans les noyaux du raphé (Newman-Tancredi, et al., 2009).

Enfin, nous avons injecté l'antagoniste MPPF à la dose de 0.16 mg/kg car il présente une affinité proche de celle du F15599, leurs K<sub>i</sub> respectifs étant de 3.3 nM et 3 nM (Maurel, et al., 2007 ; Zhuang, et al., 1994).

### **Cartes d'activation spécifiques à chaque ligand 5-HT<sub>1A</sub>**

L'ensemble des résultats présenté dans les figures 44 à 50 montre clairement que les agonistes 5-HT<sub>1A</sub> que nous avons injectés possèdent chacun un pattern d'activation spécifique. Il est remarquable que le MPPF, ligand antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, montre lui une absence d'activation. A la période T5, il est le seul ligand qui ne provoque l'activation d'aucun voxel. Ces données font écho au terme d'antagoniste silencieux

utilisé pour qualifier un analogue du MPPF, le WAY100635 (Fletcher, et al., 1996). Ce terme a été employé initialement pour différencier le WAY100635 d'autres molécules ayant un profil pharmacologique particulier envers les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Forster, et al., 1995). Les auteurs ont prouvé que le WAY100635 pouvait bloquer les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritiques ainsi que les hétérorécepteurs post-synaptiques au contraire de molécules comme le BMY7378 et le NAN-190 qui disposent d'un caractère antagoniste sur les récepteurs post-synaptiques mais de capacités d'agonistes partiels sur les autorécepteurs des noyaux du raphé. Le MPPF, analogue structurale du WAY100635 a été développé dans le but d'obtenir un radiotracer fluoré des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Plenevaux, et al., 2000). Nos résultats semblent confirmer que le MPPF possède bien lui aussi un profil pharmacologique d'antagoniste silencieux, comme l'ont attesté les chercheurs qui l'ont développé (Zhuang, et al., 1994). Cependant le terme « silencieux » pour qualifier les antagonistes doit être emprunté avec précaution. En effet, il a été démontré que le WAY10635 augmente les décharges des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé par le blocage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Ceci suggère que ces neurones sont sous l'inhibition tonique de la 5-HT endogène (Fornal, et al., 1996). Le blocage complet de cette boucle de rétrocontrôle pourrait avoir des conséquences, dans les aires de projections sérotoninergiques, susceptibles de conférer des effets pharmacologiques secondaires au WAY100635. De plus, une étude phIRM, réalisée avec un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> le SB269970, a montré une activation importante à la suite de l'injection de ce ligand (Canese, et al., 2011). Néanmoins, il n'est pas possible de comparer ces résultats avec les nôtres, car le SB267790 a été injecté à la dose de 3 mg/kg, alors que nous avons injecté le MPPF à 0.16 mg/kg. Il se peut qu'une injection d'une forte dose de MPPF provoque l'activation de certains voxels. Ainsi, le peu de voxels activés par le MPPF, entre T1 et T4, pourrait être le résultat du blocage du tonus sérotoninergique inhibiteur exercé sur les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé.

L'agoniste de référence, dont nous avons étudié le profil d'activation neuronale, est le 8-OH-DPAT. Ce dernier a été très étudié ces trente dernières années pour son caractère agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Gozlan, et al., 1983). Cependant la découverte des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> a jeté un nouveau regard sur le profil pharmacologique de ce composé. Dès les années 90, des études réalisées *in vitro* sur les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> ont révélé une

affinité non négligeable du 8-OH-DPAT pour ces récepteurs (Bard, et al., 1993 ; Lovenberg, et al., 1993 ; Ruat, et al., 1993b). Aujourd'hui, il est considéré comme un outil pharmacologique permettant l'étude des récepteurs 5-HT<sub>7</sub>, malgré son manque de spécificité envers ces récepteurs (Sprouse, et al., 2004). Or les récepteurs 5-HT<sub>7</sub> ont une distribution bien différente des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Des expériences d'hybridation *in situ*, menées sur coupes de cerveau de rat, ont déterminé la localisation de l'ARNm des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> qui montre une expression maximale dans les noyaux thalamiques. Des niveaux d'expressions plus faible ont été retrouvés dans l'hippocampe et dans les régions caudales : cervelet et tronc cérébral (Kinsey, et al., 2001). Ces données ont été confirmées par des études autoradiographiques *in vitro*. Il ressort que la plus forte densité de récepteurs 5-HT<sub>7</sub> est retrouvée dans les noyaux thalamiques (Varnas, et al., 2004). Une équipe a comparé la distribution autoradiographique des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> chez plusieurs espèces de mammifères : l'homme, le rat et le cochon d'inde. Malgré une concordance relativement bonne, avec une prédominance du thalamus puis de l'hippocampe, certaines modifications sont relatées. Notamment chez le rat, qui est la seule espèce à montrer une densité non négligeable de récepteurs 5-HT<sub>7</sub> au niveau cortical (Martin-Cora et Pazos, 2004). De plus, il est intéressant de noter que cette étude rapporte la présence chez le rat de récepteurs 5-HT<sub>7</sub> dans les noyaux du colliculus supérieur, la substance grise périaqueducal et les noyaux mésencéphalique profond.

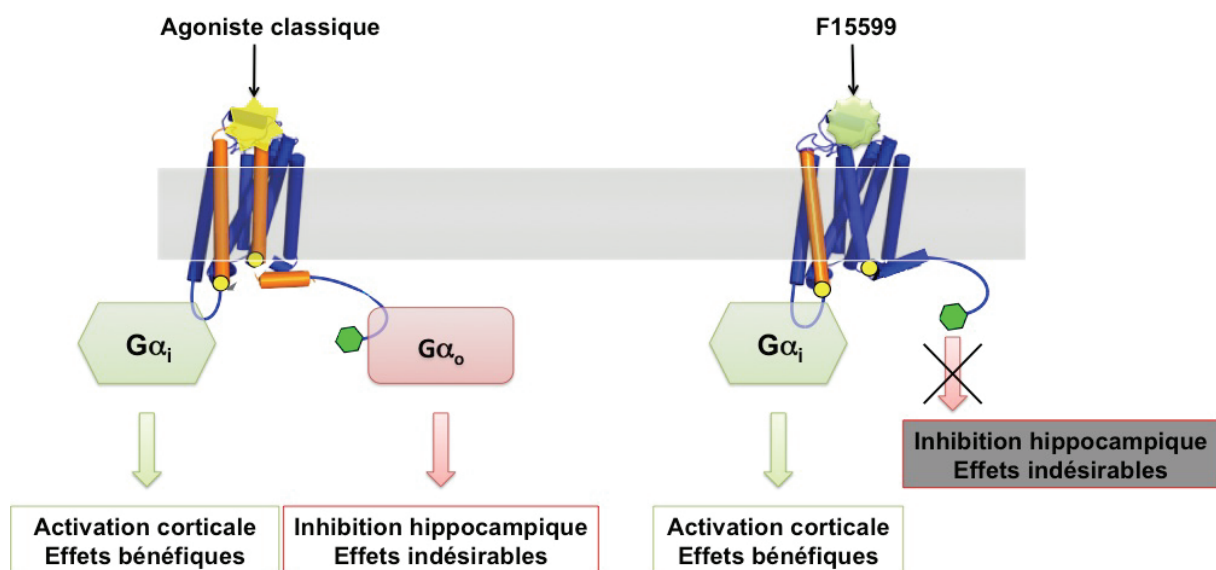
Les cartes d'activation que nous avons obtenu à la suite de l'injection du 8-OH-DPAT sont en accord avec ses caractéristiques d'agoniste mixte 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub>. En effet, la forte activation hippocampique et thalamique est probablement due à la coexistence des deux types de récepteurs sérotoninergiques dans ces structures. Au niveau caudal, l'étendue des voxels activés provient sans doute de la présence des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> dispersés dans les différentes structures. Dans les régions antérieures du cerveau, l'activation intense du striatum pourrait être due à la fois à la libération de dopamine provoquée par la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> post synaptiques et à l'action directe sur les récepteurs 5-HT<sub>7</sub>. Nos résultats sont corroborés par une étude phIRM centrée sur les récepteurs 5-HT<sub>7</sub>. Dans cette étude, les chercheurs ont montré que l'injection de l'antagoniste 5-HT<sub>7</sub> SB269970 (3 mg/kg) activait des voxels dans les noyaux accumbens et les aires thalamiques (Canese, et al., 2011). Ils ont aussi injecté du 8-OH-DPAT à faible dose (0.06 mg/kg), ce qui provoque l'activation du striatum dorsal et du thalamus. Canese *et coll.* précisent qu'à cette dose, le 8-OH-DPAT agit prioritairement sur les

récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Les aires d'activation de notre étude recouvrent très largement celles décrites par Canese *et coll.* Ainsi, il apparaît que les effets pharmacologiques du 8-OH-DPAT à la dose que nous avons utilisée, déficit mnésique et action anxiolytique, sont produits par des réseaux thalamo-hippocampique et striato-cortical. Néanmoins, les implications précises de chacun des récepteurs en question sont encore à découvrir car la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> par le 8-OH-DPAT semble contrecarrer les effets délétères qu'a celui-ci sur la mémoire via les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> hippocampiques (Eriksson, et al., 2008).

Parmi les molécules que nous avons étudié, l'agoniste F13714 possède la plus grande affinité envers les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> de toutes les molécules que nous avons étudiées, ainsi qu'une très forte sélectivité (Vacher, et al., 1999). Il a déjà été fait mention de sa fixation préférentielle sur les récepteurs autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> des noyaux du raphé (Assie, et al., 2006). Les observations décrites auparavant suggèrent que les troubles mnésiques provoqués par le F13714 sont largement imputables à l'activation d'un réseau hippocampo-striatal. Il est possible que la désensibilisation forte et rapide, induite par le F13714, des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> des noyaux du raphé provoque l'activation de ce réseau suite à l'augmentation secondaire de 5-HT dans les structures en question. Ceci pourrait être un élément d'explication des troubles mnésiques causés par le F13714, à l'image de ceux induits par le 8-OH-DPAT en agissant directement sur les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> hippocampiques (Carli, et al., 1992 ; Carli et Samanin, 1992).

Pour finir, l'agoniste F15599, qui possède lui aussi de fortes affinité et sélectivité pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, montre le profil d'activation BOLD le plus précis et spécifique (Maurel, et al., 2007). Nous avons déjà rappelé que le F15599 montre un caractère « biased agonist » prononcé pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> corticaux (Llado-Pelfort, et al., 2010). Nos résultats sont en accord avec ceux de Llado-Pelfort *et coll.* car ils montrent une activation très précise dans le cortex cingulaire ainsi que dans les aires somato-sensorielles primaires. Il est remarquable que le F15599 provoque l'activation si spécifique de voxels corticaux à la dose de 0.16 mg/kg, alors que le F13714, injecté à une dose 4 fois moins élevée, montre lui une activation étendue à un réseau hippocampo-striatal. Nos données suggèrent que les effets mnésiques bénéfiques du F15599 impliquent l'activation stricte et précise de neurones corticaux. De plus, une étude

comportementale menée chez le rat a révélé les caractéristiques antidépressives du F15599. Pour ce faire, les paradigmes expérimentaux de la nage forcée et des vocalisations ultrasoniques conditionnées induites par le stress ont été utilisés. Cette étude a montré que le F15599 réduisait le temps d'immobilité et la durée des vocalisations à faible dose (0.1 à 0.2 mg/kg i.p.) (Assie, et al., 2010). Nos résultats semblent confirmer que c'est effectivement par une activation corticale spécifique que se jouent les effets antidépresseurs du F15599. Le caractère de « biased agonist » du F15599 se manifeste par l'activation sélective des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> couplés à la protéine G $\alpha_i$ , retrouvée au niveau corticale mais non dans l'hippocampe, et par une puissance plus grande sur la voie de transduction impliquant la phosphorylation des protéines pERK 1/2 (Newman-Tancredi, et al., 2009). En conclusion, notre étude conforte l'hypothèse selon laquelle les effets promnésiques et antidépresseurs du F15599 sont dus à l'activation spécifique de neurones corticaux, via les voies de transductions liées aux protéines G $\alpha_i$  et pERK 1/2 (Figure 52).



**Figure 52 :** Illustration du caractère « biased agonist » du F15599 sur les sous-unités  $\alpha_i$  des protéines G, et ses effets pharmacologiques associés.

## Perspectives

Notre étude a comparé, pour la première fois, les schémas d'activation BOLD *in vivo* de plusieurs agonistes 5-HT<sub>1A</sub>. Nos données suggèrent que les agonistes de nouvelle génération, tel que le F13714 et le F15599, qui ciblent des voies de signalisation spécifiques, activent des réseaux neuronaux eux aussi spécifiques et bien délimités. A

ces réseaux neuronaux correspondent des actions pharmacologiques précises via l'activation de messagers secondaires sélectifs. Ainsi, nos résultats mettent en lumière l'importance de la connaissance des voies de transduction région-dépendantes, à l'instar du travail réalisé par l'équipe de Mannoury la Cour *et coll.* sur les protéines G des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Mannoury la Cour, et al., 2006). En effet, la précision de plus en plus fine de la machinerie cellulaire impliquée dans l'action de ces agonistes 5-HT<sub>1A</sub> est indispensable à la compréhension du système intégré complexe qui relie la dose d'un agoniste au comportement animal observé. Notre étude devra donc être complétée par des investigations de biologie cellulaire, avec notamment des immunoblots permettant la mise à jour des voies de signalisation impliquées dans l'activation des réseaux neuronaux.

D'autres expériences nécessaires à la validation de nos hypothèses concernent la localisation cérébrale précise du site d'action de nos agonistes F15599 et F13714. Pour ce faire, nous pouvons envisager des études de compétition en imagerie  $\mu$ TEP avec le radiotracteur 5-HT<sub>1A</sub> de référence, le [<sup>18</sup>F]MPPF. Effectivement, la compétition de nos agonistes, aux doses utilisés dans nos travaux, avec le [<sup>18</sup>F]MPPF nous permettra de mettre en évidence les zones d'action primaires du F13714 et du F15599 et donc de corrélérer les données de localisation du site d'action avec les réseaux impliqués dans l'action pharmacologique, ainsi qu'avec les comportements cognitifs ou mnésiques observés.

Cette approche TEP pourra être couplée directement à l'IRMph grâce à l'installation prochaine d'une caméra hybride TEP-IRM clinique, permettant d'explorer ces paradigmes inédits, chez le chat par exemple.

Pour finir, il apparaît que l'IRMph est un outil puissant pour étudier le profil des agents pharmacologiques modernes. Il est probable que cette technique d'imagerie sera appliquée à l'étude de modèles animaux. Les agents pharmacologiques destinés aux traitements des maladies neurodégénératives constituent un champ d'investigation dans lequel l'IRMph aura toute sa place dans un futur proche.



### III. Imagerie TEP des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>

#### A. Rationnel

L'ensemble des investigations menées sur les ligands 5-HT<sub>6</sub>, a conduit plusieurs équipes à développer des traceurs sélectifs utilisables en imagerie TEP, permettant ainsi l'exploration *in vivo* de ces récepteurs.

Un des premiers radiotraceurs fluorés a été développé dans notre laboratoire. Il s'agit du [<sup>18</sup>F]12ST05. Malgré la bonne pénétration cérébrale de ce traceur, son développement a été arrêté en raison d'un manque de spécificité et de sélectivité du traceur fluoré. Il semble que l'incorporation du fluor dans la molécule de départ, le 12ST05, ait modifié son affinité vis à vis des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Les auteurs avancèrent également une autre hypothèse selon laquelle, ce radiotracer pourrait avoir un autre site de liaison inconnu, responsable du manque de spécificité (Tang, et al., 2007).

Une autre équipe a tenté le radiomarquage, au carbon 11, d'un ligand antagoniste 5-HT<sub>6</sub>. Les investigations concernant ce traceur, le [<sup>11</sup>C]SB399885, ne furent pas poussées plus avant, malgré de bonnes puretés chimique et radiochimique. En effet, il montra une pénétration cérébrale décevante et un schéma de fixation en désaccord avec la distribution connue des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Liu, et al., 2011).

A ce jour, le radiotracer le plus abouti a été développé par les laboratoires GSK. Une équipe du laboratoire a publié le marquage au carbone 11 d'un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le GSK215083 (Martarello, et al., 2005). Ce radiotracer carboné, [<sup>11</sup>C]GSK215083, correspond aux critères requis en terme de dosimétrie pour être utilisé en étude *in vivo* chez l'homme (Comley, et al., 2012). Cependant, après son évaluation *in vivo*, sur différents modèles animaux, et chez l'homme, il apparaît que le manque de sélectivité du [<sup>11</sup>C]GSK215083 pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> par rapport aux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> représente une limite majeure à son développement ultérieur (Parker, et al., 2012).

## B. Objectif

De par leur localisation exclusivement cérébrale, et leur implication dans les processus cognitifs, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>6</sub> constituent une cible thérapeutique potentielle dans les troubles cognitifs liés à la MA. Ce champ d'investigation connaît un intérêt croissant ces dernières années. Cependant, l'avancée des connaissances *in vivo* de ces récepteurs est freinée par le manque d'outils pharmacologiques disponibles pour les étudier. L'imagerie TEP est un moyen privilégié pour approfondir notre compréhension de ces récepteurs, ainsi que leur implication dans les processus physiopathologiques. C'est dans ce contexte que plusieurs équipes ont travaillé à la mise au point de radiopharmaceutiques TEP permettant des études d'imagerie *in vivo*. Les travaux de thèses présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans la perspective de proposer le premier radiotracteur TEP fluoré des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>.

L'obtention de ce radiotracteur nécessite une collaboration pluridisciplinaire entre chimistes organiciens, radiochimistes, et radiopharmacologues. En effet, ces diverses compétences sont indispensables pour valider toutes les étapes nécessaires à la production d'un radiotracteur utilisable chez l'homme *in fine*.

## C. Matériels et méthodes

### 1. Sélection des ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub>.

#### a) Synthèse des antagonistes 5-HT<sub>6</sub>

La première étape du versant chimie organique des travaux concernant les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, fut de sélectionner les meilleurs radioligands potentiels, parmi 9 antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> synthétisés. Ce travail de synthèse organique a été réalisé par Julie Colomb (travaux de thèse) au sein du laboratoire de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (UMR CNRS 5246).

Sur la base des pharmacophores déjà décrits dans la littérature (Holenz, et al., 2005 ; Lopez-Rodriguez, et al., 2005), l'équipe de chimistes organiciens a synthétisé, à partir d'un noyau quinoléine, 9 ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub> potentiellement radiomarquables au <sup>18</sup>F (Figure 53).

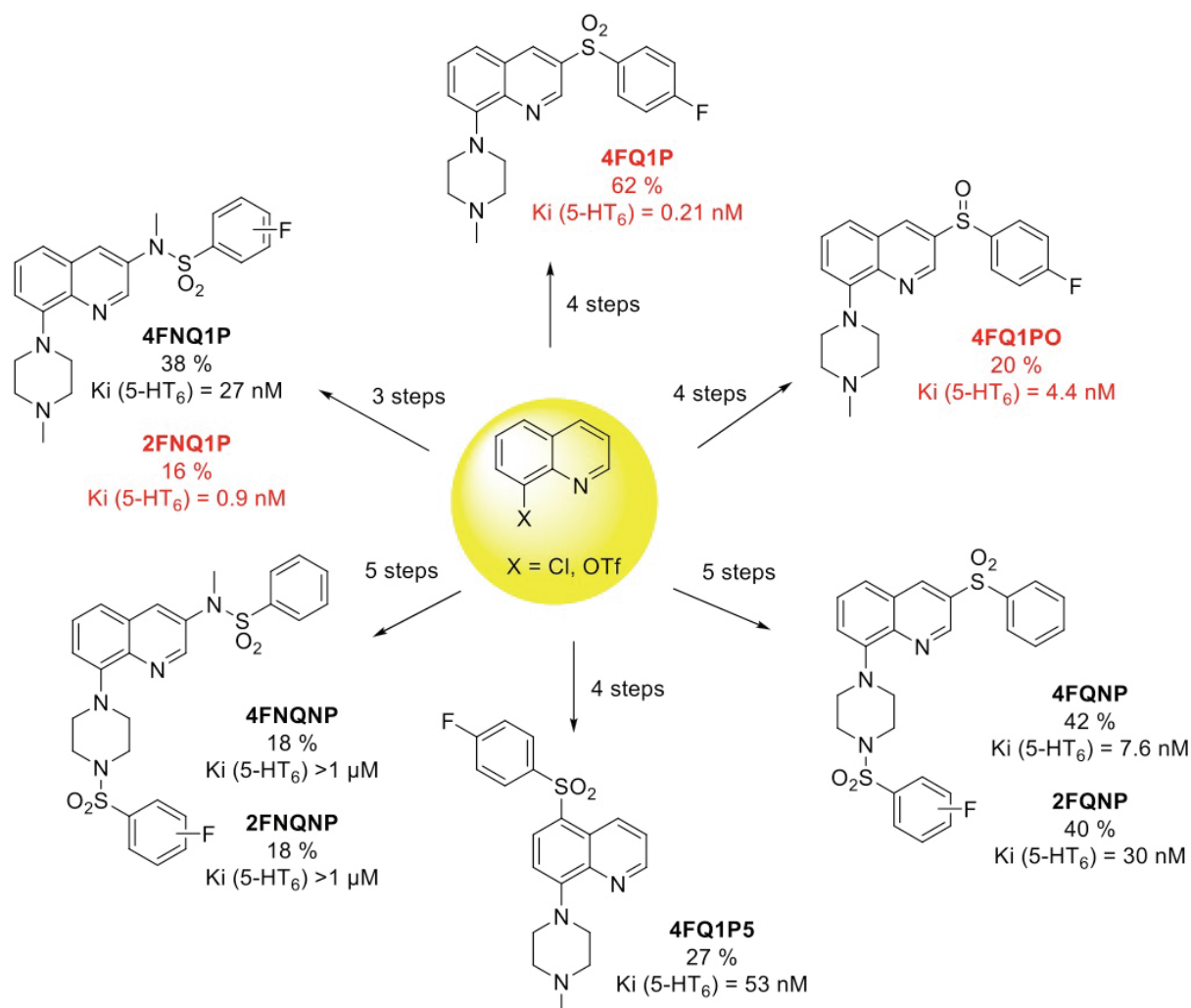
L'étape de sélection des meilleurs ligands potentiels s'est faite sur la base de leur affinité respective pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. La détermination de l'affinité *in vitro* des ligands pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> a été sous-traitée à une entreprise spécialisée, la CEREP ([www.cerep.fr](http://www.cerep.fr)).

Trois ligands ont été sélectionnés pour passer aux étapes suivantes de radiomarquage et de caractérisation pharmacologique. Il s'agit du 4FQ1P, du 4FQ1PO et du 2FNQ1P. Leur affinité respective, exprimée par le Ki (constante d'inhibition), vis à vis des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont 0.21 nM, 4.4 nM et 0.9 nM.

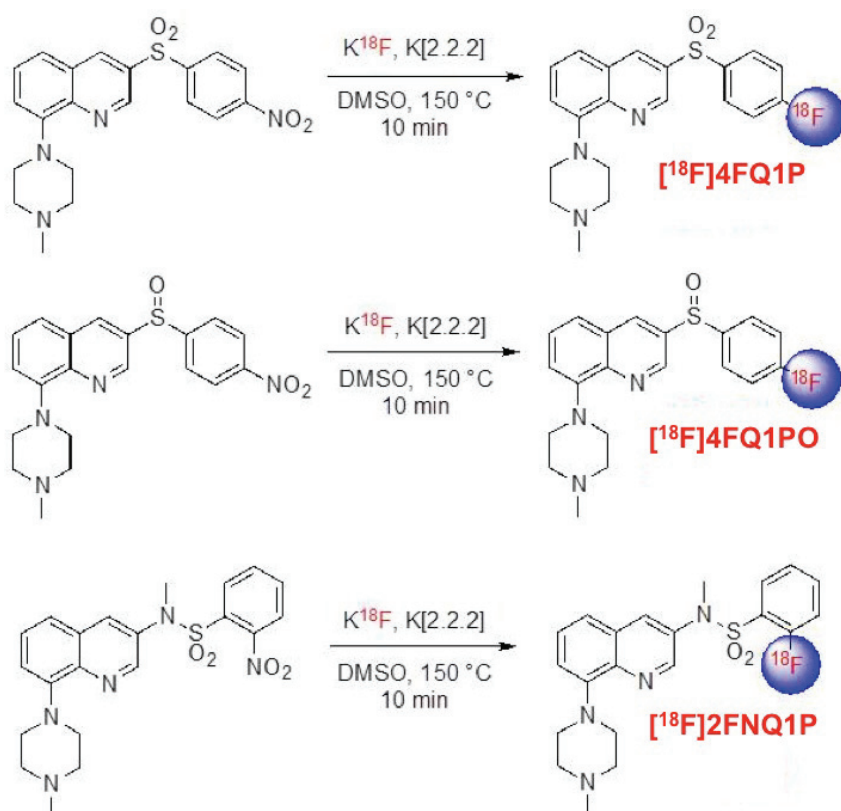
#### b) Radiomarquage des ligands sélectionnés

De la même façon que pour les agonistes 5-HT<sub>1A</sub>, l'étape de radiosynthèse démarre par la production du fluor 18 radioactif par le cyclotron (*cf.* II.A.3.a). L'incorporation du <sup>18</sup>F dans les ligands a été faite par la réaction de substitution nucléophile aromatique. Le terme substitution renvoie au fait que le fluor est substitué à un groupe dit « partant », constitué par la fonction nitro : NO<sub>2</sub>. Ainsi, les chimistes ont du synthétiser, en parallèle des ligands « froids » (comprenant un atome de fluor non radioactif), les précurseurs nitrés des radioligands. Cette substitution est qualifiée de nucléophile aromatique car elle nécessite un groupement attracteur d'électrons, le groupement SO<sub>2</sub> pour nos ligands, en position ortho ou para du cycle benzène aromatique.

Le fluor produit par le cyclotron, et récupéré sous sa forme fluorure  $^{18}\text{F}$ , réagit en présence d'un carbonate alcalin, le  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Le produit  $\text{K}^{18}\text{F}$  formé réagit avec 10 mg de précurseur dans le DMSO (3 ml) à  $150^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes, en présence du catalyseur Kryptofix 2.2.2 (Figure 54).



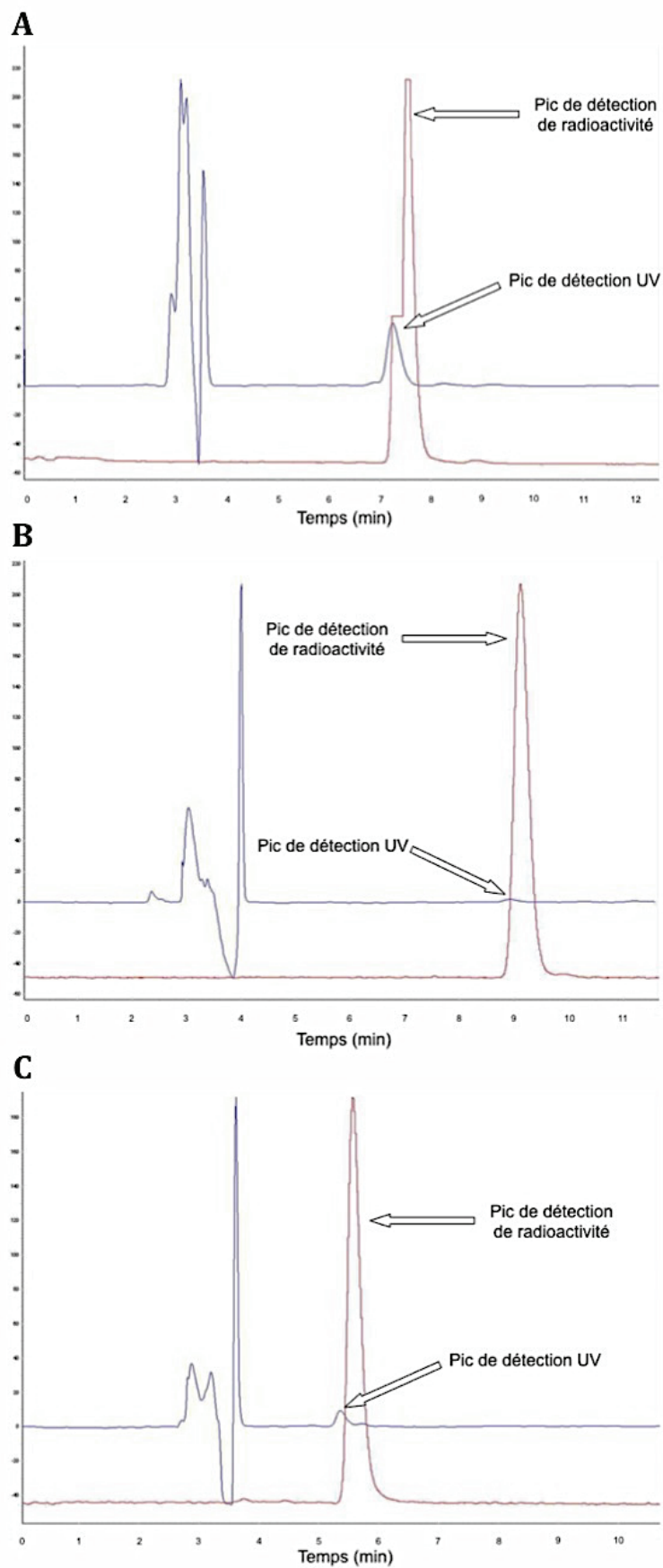
**Figure 53** : Schéma générale résumant la synthèse des ligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub>. Au centre se trouve le noyau quinoléine à partir duquel ont été réalisées les synthèses. Les noms des ligands sont indiqués en gras, le pourcentage correspond au rendement de synthèse. Les Ki (5-HT<sub>6</sub>) indiquent l'affinité des ligands pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Les ligands indiqués en rouge sont les trois sélectionnés.



**Figure 54 :** Radiosynthèse des traceurs  $[^{18}F]4FQ1P$ ,  $[^{18}F]4FQ1PO$  et  $[^{18}F]2FNQ1P$ .

Le mélange est ensuite purifié sur une cartouche d'extraction en phase solide C18 qui retient les composés organiques. Puis la purification continue avec une HPLC semi-préparative sur colonne (Semiprep Symmetry C18,  $7\mu\text{m}$ ,  $7.8 \times 300\text{ mm}$ ). Le reste du mélange réactionnel est ensuite séparé par HPLC préparative en phase inverse, sur colonne C18, permettant l'isolement des molécules radiomarquées. La pureté de la fraction récupérée est ensuite vérifiée par HPLC analytique qui couple un détecteur UV avec un détecteur de radioactivité. Cette étape permet le calcul de la pureté radiochimique, du rendement de radiomarquage et de l'activité spécifique (AS) du produit final (Figure 55).

Les trois radioligands ont tous une pureté radiochimique  $> 95\%$ . Le  $[^{18}F]4FQ1P$  a un rendement de radiomarquage de  $38\%$  ( $n = 4$ ) et une AS de  $51\text{ GBq}/\mu\text{mol EOS}$  (« End of synthesis »). Le  $[^{18}F]4FQ1PO$  a un rendement de radiomarquage de  $1\%$  ( $n = 4$ ) et une AS de  $86\text{ GBq}/\mu\text{mol EOS}$ . Enfin, le  $[^{18}F]2FNQ1P$  a un rendement de radiomarquage de  $36\%$  ( $n = 5$ ) et une AS de  $82\text{ GBq}/\mu\text{mol EOS}$ .



**Figure 55:** Chromatogrammes des contrôles qualités du  $[^{18}\text{F}]4\text{FQ1P}$  (A),  $[^{18}\text{F}]4\text{FQ1PO}$  (B) et du  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  (C).

### **c) Lipophilie et affinité *in vitro***

Sur les 3 radioligands choisis, un seul sera développé ultérieurement et caractérisé précisément. Ainsi, après la première sélection, une deuxième étape consiste à déterminer les propriétés de chacun des trois candidats afin de choisir celui qui se conforme le mieux aux critères des radiopharmaceutiques.

Tout d'abord, la lipophilie est un critère majeur. En effet, celle-ci ne doit pas être trop élevée pour éviter un marquage non spécifique trop important, tout en l'étant suffisamment pour permettre le passage de la BHE. Historiquement, elle est évaluée par le coefficient de partition dans un mélange octanol/eau, c'est le Log P. Lorsque ce Log P est calculé à pH physiologique (7.4), on parle de Log D. Ce dernier a été modélisé pour chacun de nos radioligands, par un logiciel informatique (ACD/labs software, version 7.0).

Un autre facteur déterminant pour l'élection de notre radiopharmaceutique candidat fut la sélectivité des trois radioligands pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> vis à vis des 5-HT<sub>2A</sub>. En effet, le pharmacophore du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est connu pour être proche de celui du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Ainsi, le manque de sélectivité 5-HT<sub>6</sub>/5-HT<sub>2A</sub> a été un écueil de plusieurs molécules candidates (cf. biblio ref.). Les affinités *in vitro* de nos traceurs pour les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> ont donc été déterminées, de façon analogue à l'affinité 5-HT<sub>6</sub> en sous-traitant à la CEREP.

## **2. Les animaux et les procédures animales**

Toutes les expérimentations sont conduites en accord avec le comité français d'éthique animale et selon les directives du conseil de la communauté européenne (86/609/EEC) relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales. Les travaux ont débuté après accord du comité local d'éthique animal de l'université Claude Bernard Lyon 1.

### **a) Les animaux**

#### **i. Rats**

Des rats mâles adultes, de souche Sprague-Dawley (Charles River laboratories, l'Arbresle, France), pesant  $250 \pm 100$  g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C) et d'humidité

(50 %). Le cycle jour/nuit est maintenu à 12h/12h (lumière artificielle de 7h00 à 19h00), l'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum*.

## ii. Chats

Les expérimentations en imagerie TEP sont réalisées sur des chats mâles européens adultes (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), hébergés dans une pièce commune de stabulation (24°C et 50 % d'humidité) avec un cycle jour/nuit de 12h/12h.

### **b) Les procédures animales**

#### i. Anesthésie

Toutes les études d'imagerie *in vivo*, TEP pour les chats ou  $\mu$ TEP pour les rats, sont réalisées sur des animaux anesthésiés à l'isoflurane (AErane, Baxster France). Le choix de l'anesthésie gazeuse à l'isoflurane est motivé par sa faible toxicité, permettant le réveil et la survie « au long cour » des animaux.

Les rats sont placés dans une boîte d'induction hermétique avec insufflation d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane 4 %. Puis, l'anesthésie est maintenue avec un mélange d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane à 2 %. Ce type d'anesthésie provoquant une hypothermie, les rats sont placés sur un tapis chauffant pour maintenir la température à  $37 \pm 0,2$  °C.

Les chats sont eux aussi anesthésiés à l'isoflurane selon un protocole similaire. Après induction dans une boîte hermétique à 4 % d'isoflurane et 3 L/min d'air respirable, l'anesthésie est maintenue par insufflation d'isoflurane (2,5 %) sans intubation, et en respiration spontanée pour toute la durée de l'examen TEP. Pour éviter tout risque d'hypothermie, l'animal anesthésié est placé sur un tapis chauffant à circulation d'eau.

#### ii. Cathétérisation

L'injection de radiotraceurs TEP s'effectue uniquement par voie intraveineuse. Ainsi, chaque rat anesthésié subit une cathétérisation d'une veine caudale (24 gauges, Becton Dickinson, NJ, USA) afin de procéder aux injections ultérieures du radiotraceur ou des agents pharmacologiques.

Les chats sont cathétérisés au niveau la veine surale, par un cathéter stérile et apyrogène (20 gauges, Becton Dickinson, NJ, USA). La première étape consiste à raser la



patte du chat, puis après la pose du cathéter, une solution de sérum physiologique (NaCl 0,9 %) est perfusée à très bas débit, en attendant l'injection du radiotracteur.

### **c) Les traitements pharmacologiques**

#### **i. SB-258585 :**

4 - Iodo - N - [4 - methoxy - 3 - (4 - methyl - 1 - piperazinyl) phenyl] benzenesulfonamide hydrochloride (Tocris, UK). Le SB-258585 est un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dont l'affinité, évaluée par le K<sub>i</sub>, est de 3,2 nM.

#### **ii. Ciclosporine :**

[R-[[R\*, R\*-(E) ]]-cyclic (L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl-3-hydroxy-N, 4-dimethyl-L-2-amino-6-octenoyl-L-α-amino-butyryl-N-methylglycyl-N-methyl-L-leucyl-L-valyl-N-methyl-L-leucyl) (Sandimmun, Novartis, France). Elle est utilisée en pratique clinique comme immunomodulateur ou immunosuppresseur, dans le cadre de transplantation d'organes ou de traitements anticancéreux. Dans notre étude, elle est utilisée pour sa propriété inhibitrice des glycoprotéines P (PgP). Ces dernières sont situées, notamment, au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE), où elles jouent le rôle de protéines d'efflux. Ce mécanisme peut conduire à diminuer la pénétration cérébrale de certains radiotraceurs. Dans nos protocoles, elle est utilisée à la dose de 50 mg/kg, diluée dans du sérum physiologique.

### **d) Les techniques utilisées**

#### **i. Autoradiographies *in vitro***

Les rats sont anesthésiés par une induction « flash » à l'isoflurane, puis ils sont euthanasiés par décapitation. Le cerveau est prélevé dans la foulée, rincé dans de l'eau distillée puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à -30°C par ajout de carboglace. Les cerveaux sont conservés quelques jours à -80°C. Des coupes coronales de 30 μm d'épaisseur sont réalisées sur un cryostat (Leica SM1850, Leica) dont l'enceinte est thermostatée à -20°C. Les régions d'intérêt (Striatum) sont repérées à l'aide d'un atlas stéréotaxique du rat (Paxinos et Watson, 1986), puis les coupes sont fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Starfrost®). Les lames

contenant les coupes sont ensuite conservées quelques jours à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant les expériences d'autoradiographie.

Le jour de la radiosynthèse, les lames sériées, congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sont placées à température ambiante durant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées durant 20 minutes, à température ambiante, dans du tampon TBS-HCl pH 7.5 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, Sigma-Aldrich, France) contenant 37 kBq/ml (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) des ligands 5-HT<sub>6</sub>: [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, [<sup>18</sup>F]4FQ1P, [<sup>18</sup>F]2FQ1P et [<sup>18</sup>F]4FQ1PO. La fixation non spécifique des traceurs est déterminée par ajout de sérotonine en excès (10  $\mu\text{M}$ ) dans le bain d'incubation. A la fin de l'incubation, les lames sont lavées 90 secondes dans du tampon TBS-HCL pH 7.5 à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis 90 secondes dans de l'eau distillée à  $4^{\circ}\text{C}$  avant d'être séchées par un léger flux d'air ambiant. Les lames sont ensuite apposées contre les écrans du phospho-imageur, dans une cassette, pendant 60 minutes. Les images sont révélées en quelques minutes par le logiciel « Image Reader », puis les régions d'intérêt sont tracées manuellement grâce au logiciel d'analyse « Multigauge » (Fujifilm, Raytest, Germany), à l'aide d'un atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1986). Les valeurs de signal non spécifique sont soustraites aux valeurs semi-quantitatives obtenues dans les régions d'intérêt. Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en psl/mm<sup>2</sup> (« phospho stimulated luminescence » par unité de surface).

Nous avons réalisé des expériences de compétition avec l'antagoniste 5-HT<sub>6</sub> SB-258585, rajouté aux bains d'incubation à différentes concentrations : 10 nM, 100 nM et 1  $\mu\text{M}$ . De la même façon, les ligands froids, correspondant à chaque radiotraceurs, ont été ajoutés aux bains à la concentration de 1  $\mu\text{M}$ .

## ii. Imagerie TEP et microTEP

### (a) Réalisation des examens $\mu\text{TEP}$ chez le rat

La caméra  $\mu\text{TEP}$  présente au CERMEP est entièrement dédiée à l'imagerie TEP du petit animal. Il s'agit d'une machine préclinique PET/CT Inveon de Siemens (Siemens, Germany), dont le système d'acquisition fonctionne en 3 dimensions.

Lorsque l'induction est terminée et que la cathétérisation a été réalisée, le rat est placé en décubitus ventral sur un lit adapté (Bruker Animal Handling Systems). L'anesthésie gazeuse est maintenue pendant toute la durée de l'examen à un taux de 2 % d'isoflurane.

La fréquence respiratoire est surveillée grâce à un capteur de pression connecté à un ordinateur (Biovet, USA). L'acquisition démarre après un scanner de transmission de 10 minutes.

Chaque radiotracer est injecté en bolus de  $37 \text{ kBq.g}^{-1}$  ( $1 \mu\text{Ci.g}^{-1}$ ) via le cathéter implanté dans la veine caudale. L'activité spécifique des radiotraceurs se situe entre 85 et 120  $\text{GBq.}\mu\text{mol}^{-1}$ . La quantité de radioactivité est mesurée sur une série de 24 « frames » de durée croissante de 20 secondes à 5 minutes, la durée totale d'acquisition est de 60 minutes. Lorsque l'acquisition est terminée, les images sont reconstruites sur un plan frontal. Les régions d'intérêts (ROI pour « regions of interest »), le striatum, le cortex cingulaire et le cervelet, sont tracées manuellement à l'aide de l'atlas stéréotaxique du rat (Paxinos et Watson, 1986). Les valeurs de radioactivité obtenues sont exprimées en SUV.

*(b) Réalisation des examens TEP chez le chat*

Le laboratoire du CERMEP possède deux caméras TEP permettant la réalisation des examens TEP chez le chat. La caméra ECAT EXACT HR+ fabriquée par CTI (Knoxville, Tennessee, USA) et commercialisée par Siemens. Celle-ci a une résolution axiale de 4.1 mm et transverse de 4.4 mm. Ceci lui permet de générer 63 coupes cérébrales jointes, d'une épaisseur de 2.46 mm. La deuxième caméra, acquise en 2010, est une Biograph mCT fabriquée par Siemens (Siemens, Healthcare Sector, Erlangen, Germany).

Le chat anesthésié à l'isoflurane est placé en décubitus ventral sur le lit du tomographe. Le chat est placé dans un cadre stéréotaxique en plexiglas qui permet le maintien latéral grâce à des barres d'oreilles, et horizontal grâce au masque d'anesthésie. Ce système permet un positionnement stable et reproductible de la tête de l'animal sous la caméra TEP. La température de l'animal est maintenue à  $37^{\circ}\text{C}$  par une couverture chauffante à circulation d'eau (Hamilton Industries, Ohio, USA). Le rythme cardiaque et la saturation sanguine en oxygène sont suivis tout au long de l'acquisition par un oxymètre (Nonin 9847V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA) installé sur une oreille. Un scanner de transmission, visant à déterminer l'atténuation osseuse, est réalisé avant l'acquisition TEP.

Chaque radiotracteur est injecté en bolus de 92.5 MBq (2.5 mCi) via le cathéter implanté dans la veine surale. L'activité spécifique des radiotraceurs se situe entre 85 et 120 GBq.μmol<sup>-1</sup>. La quantité de radioactivité est mesurée sur une série de 31 séquences (« frames ») d'une durée croissante de 30 secondes à 10 minutes. La durée totale d'acquisition est de 90 minutes. Lorsque l'acquisition est terminée, les images sont reconstruites sur un plan frontal. Les régions d'intérêt (ROI pour « regions of interest »), le striatum, le cortex cingulaire et le cervelet, sont tracées manuellement à l'aide de deux atlas stéréotaxiques du cerveau de chat (Jasper et Ajmone-Marsan, 1954 ; Snider et Niemer, 1961). Les images reconstruites avec la caméra ECAT EXACT HR+ sont analysées avec le logiciel « Capp » (Clinical application programming package), alors que les images obtenues sur la caméra Biograph mCT sont analysées avec le logiciel IRW (« Inveon Research Workplace»). Les courbes d'activité régionale sont exprimées en « SUV » (Standard Uptake Values) après normalisation de la dose injectée par rapport au poids de l'animal.

## D. Résultats

### 1. Pharmacologie *in vitro* et lipophilie

Les études pharmacologiques *in vitro*, sous-traitées à la CEREP, montrent que le ligand qui à la plus forte affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> est le 4FQ1P, avec un Ki à 0.21 nM. Vient ensuite le 2FNQ1P, dont le Ki est de 0.9 nM, puis le 4FQ1PO avec un Ki à 4.4 nM. En ce qui concerne la sélectivité des ligands par rapport aux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, c'est le 2FNQ1P qui montre le moins d'affinité pour ces récepteurs, avec un Ki (5-HT<sub>2A</sub>) supérieur à 10<sup>-6</sup> M. Le ligand 4FQ1PO possède une faible affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, puisque son Ki est de 54 nM. En revanche, le 4FQ1P présente une forte composante 5-HT<sub>2A</sub>, car son Ki est de 1.27 nM (Tableau 5).

Ligand	4FQ1P	4FQ1PO	2FNQ1P
Ki 5-HT <sub>6</sub> (nM)	0.21	4.4	0.9
Ki 5-HT <sub>2A</sub> (nM)	1.7	54	>10 <sup>-6</sup> M
Log D <sub>7,4</sub>	3.01	2.00	1.86

**Tableau 5 :** Résumé des affinités *in vitro*, vis à vis des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>2A</sub>, et de la lipophilie des trois antagonistes 5-HT<sub>6</sub> sélectionnés.

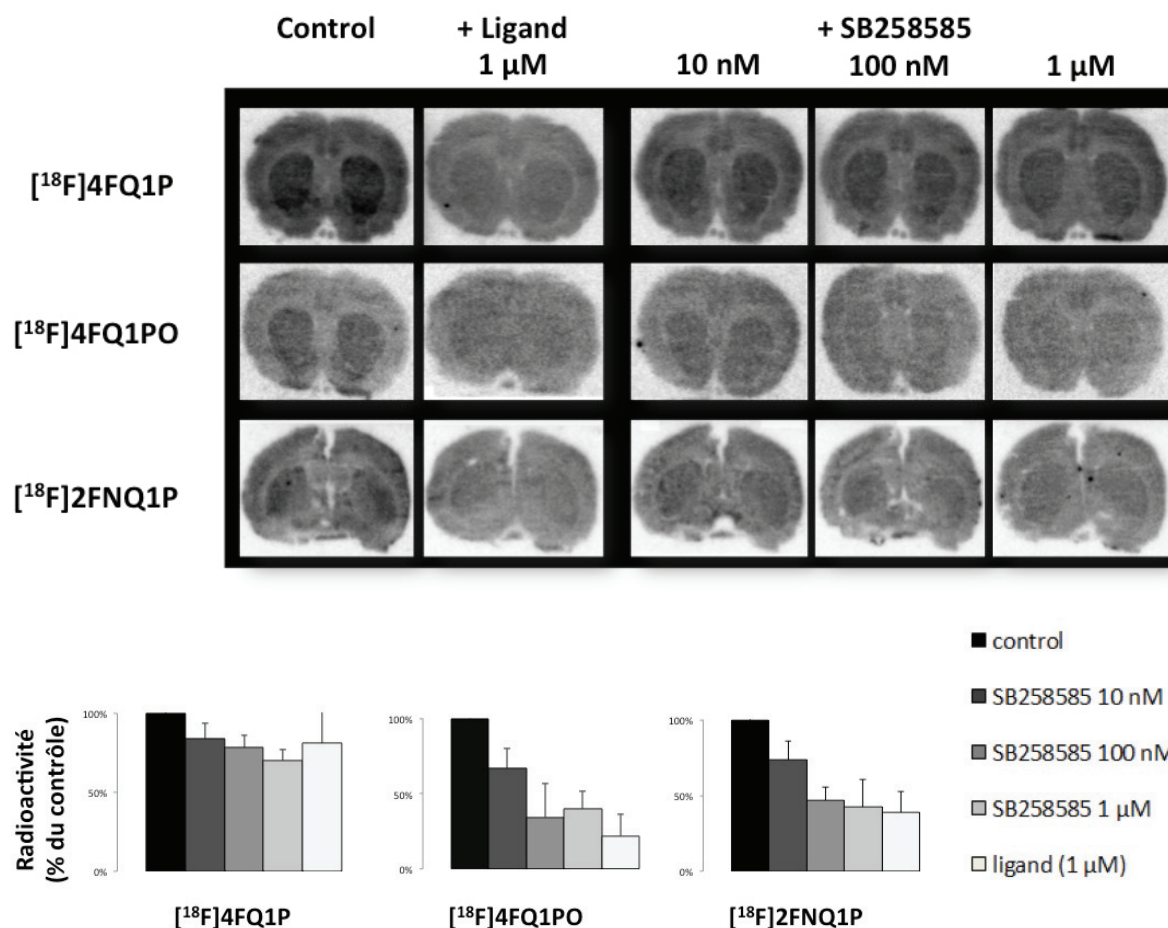
Le LogD<sub>7,4</sub> a été calculé avec le logiciel ACD-Lab, il exprime la lipophilie des molécules, qui est de 3.01 pour le 4FQ1P, 2.00 pour le 4FQ1PO et de 1.86 pour le 2FNQ1P.

### 2. Autoradiographies *in vitro*

Les autoradiographies *in vitro* ont été réalisées sur des coupes de cerveaux de rats témoins pour chacun des radioligands. Les bains contrôles (contenant uniquement le radiotracteur) montrent, pour les trois molécules, une distribution en accord avec la répartition connue des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. En effet, les trois radioligands marquent fortement le striatum (noyaux caudés et putamen, soudés chez le rat), ainsi que, dans une moindre mesure le cortex, notamment le cortex cingulaire.

Les expériences de déplacement par les ligands froids (correspondant aux ligands radiomarqués) montrent, pour le [<sup>18</sup>F]4FQ1PO et le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, une diminution du

signal mesuré dans le striatum de plus de 50 %. En revanche, le signal du [ $^{18}\text{F}$ ]4FQ1P, dans le striatum, reste à environ 80 % du contrôle, malgré l'ajout de 1  $\mu\text{M}$  de 4FQ1P froid au bain d'autoradiographie.



**Figure 56 :** Autoradiographies *in vitro* au [ $^{18}\text{F}$ ]4FQ1P, [ $^{18}\text{F}$ ]4FQ1PO et [ $^{18}\text{F}$ ]2FNQ1P sur coupes de striatum de rat ( $n = 2$ ). Trois paradigmes expérimentaux sont représentés pour chaque radiotracer : autoradiographie témoin (control), déplacement au ligand froid et compétition avec l'antagonistes SB258585 (à trois concentrations : 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ ). Les histogrammes représentent les valeurs semi-quantitatives ( $\pm$  SEM) correspondantes de la fixation des radioligands (en % du contrôle) dans le striatum.

Les études de compétition avec l'antagoniste SB258585 révèlent une diminution progressive du signal striatal. Cette baisse progressive, et dépendante des doses croissantes de SB258585 rajoutées au milieu d'incubation, est faible pour le [ $^{18}\text{F}$ ]4FQ1P, car même avec 1  $\mu\text{M}$  de SB258585, le signal reste à 80 % du contrôle. En revanche, la compétition entre les traceurs [ $^{18}\text{F}$ ]4FQ1PO ou [ $^{18}\text{F}$ ]2FNQ1P et l'antagoniste SB258585

est forte, avec un signal qui descend en dessous des 50 % du contrôle dès que l'antagoniste est ajouté à la concentration de 100 nM (Figure 56).

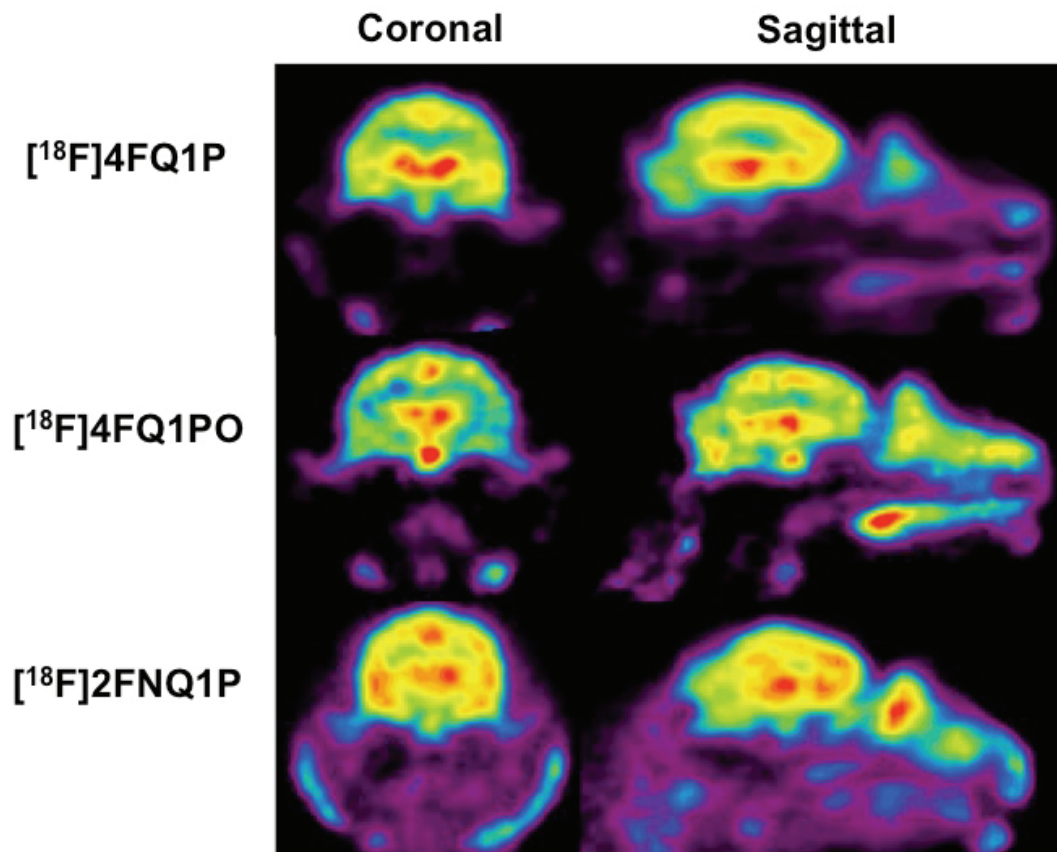
### **3. Pénétration cérébrale *in vivo***

#### ***a) Imagerie TEP chez le chat***

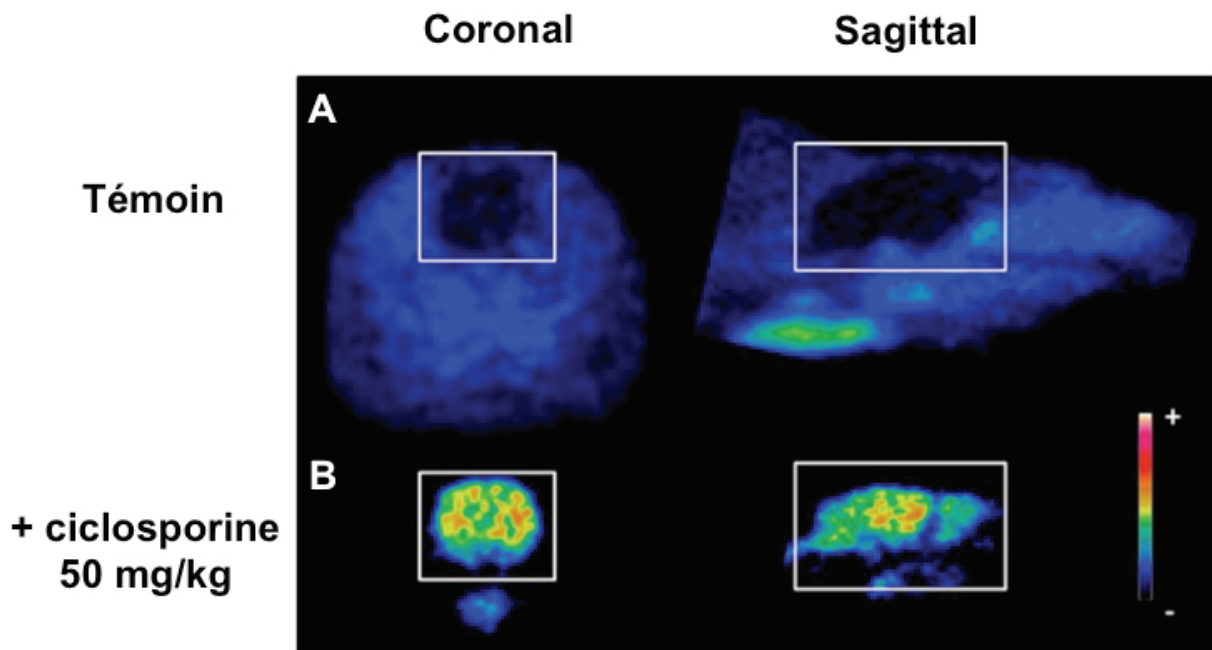
Dans le but de déterminer si les trois radiotraceurs 5-HT<sub>6</sub> sélectionnés ont la capacité de traverser la BHE, nous avons réalisé une acquisition TEP, sur caméra ECAT EXACT HR+. Les injections intraveineuses de [<sup>18</sup>F]4FQ1P, [<sup>18</sup>F]4FQ1PO et [<sup>18</sup>F]2FNQ1P ont montré une bonne pénétration au travers de la BHE. Les trois radioligands présentent une accumulation uniquement cérébrale, en accord avec la localisation strictement intracérébrale des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Figure 57).

#### ***b) Imagerie $\mu$ TEP du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P chez le rat.***

L'injection intraveineuse de [<sup>18</sup>F]2FNQ1P chez le rat témoin montre l'absence totale d'accumulation cérébrale du radiotraceur (Figure 58 A). En revanche, lorsque la ciclosporine est pré-injectée 30 minutes avant le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, à une concentration de 50 mg/kg, les images  $\mu$ TEP révèlent une accumulation intracérébrale importante (Figure 58 B).



**Figure 57 :** Images TEP, reconstruites par la caméra ECAT EXACT HR+, de la fixation des  $[^{18}\text{F}]4\text{FQ1P}$ ,  $[^{18}\text{F}]4\text{FQ1PO}$  et  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  dans le cerveau d'un chat.



**Figure 58 :** Images  $\mu\text{TEP}$  de la fixation du  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  chez un rat témoin (**A**) et chez le même rat pré-traité par la ciclosporine (50 mg/kg ; **B**).

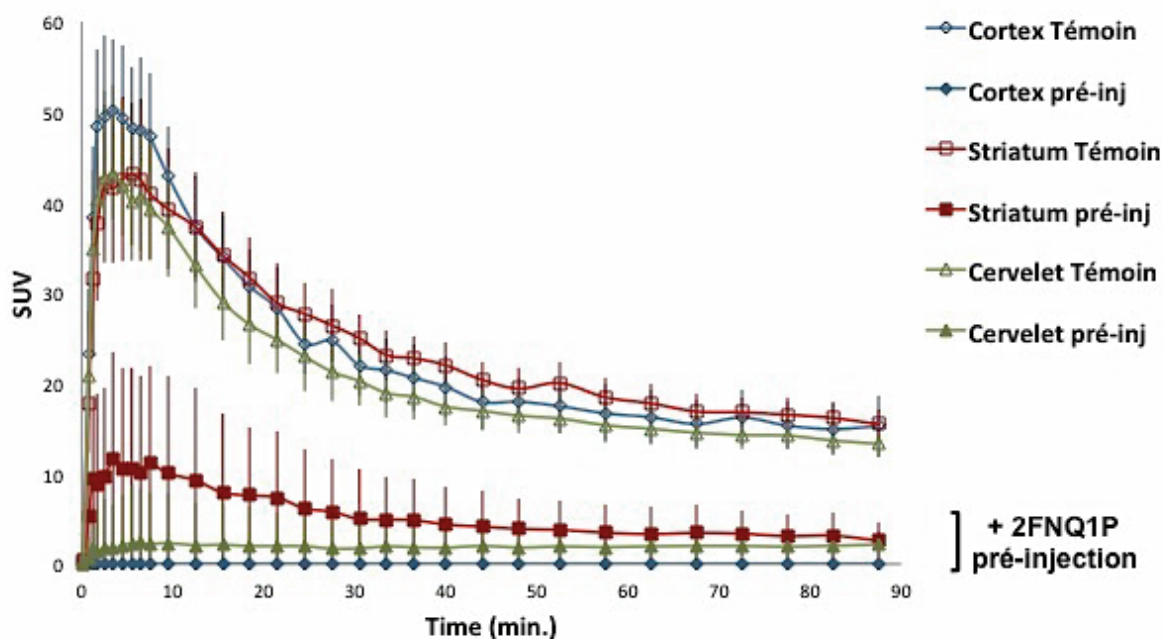
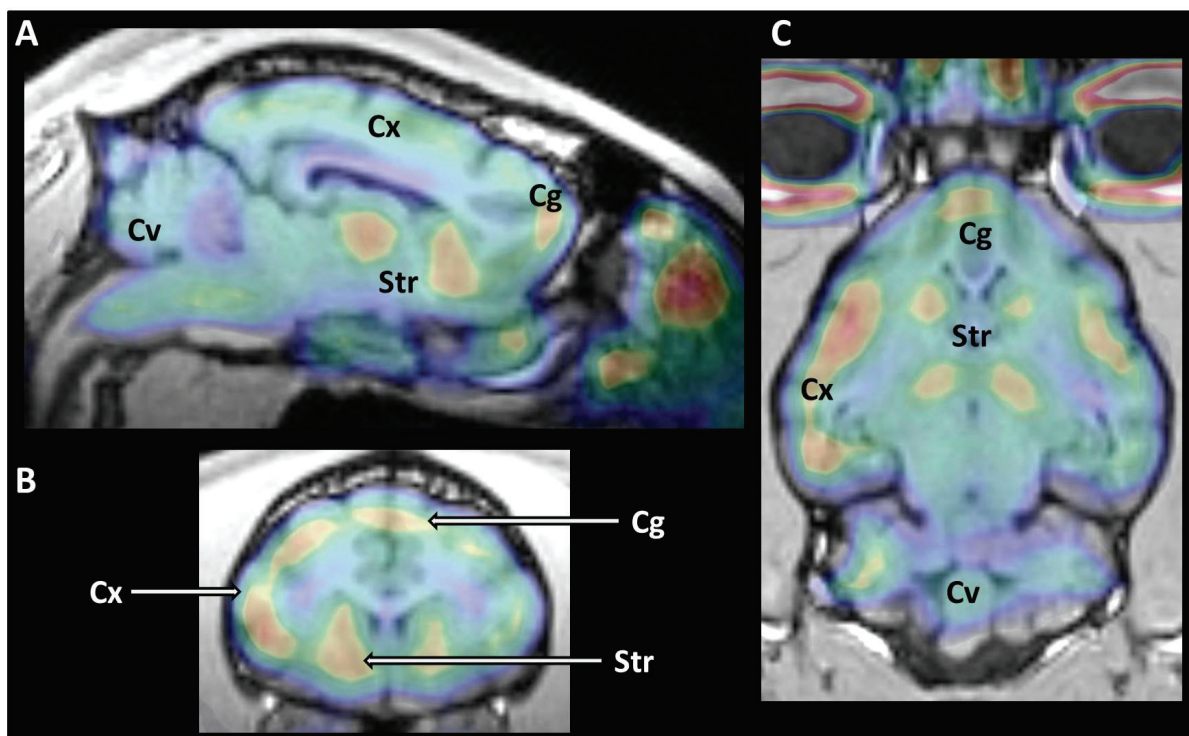


#### 4. **Imagerie TEP *in vivo* chez le chat du radioligands [18F]2FNQ1P**

##### ***a) Cinétique de fixation du [18F]2FNQ1P et compétition avec le ligand froid***

L'analyse cinétique, réalisée grâce à la caméra TEP haute résolution Biograph mCT de Siemens, a montré le passage de la BHE par le [18F]2FNQ1P dès les premières minutes qui suivirent l'injection chez le chat. Les courbes de cinétiques de la radioactivité régionale ont révélé une forte intensité de fixation du [18F]2FNQ1P dans le striatum, le cortex cingulaire et le cervelet. Les cinétiques radioactives des différentes régions d'intérêt (ROI) étaient similaires, avec un pic radioactif entre 3 et 5 minutes. La décroissance est rapide pour les trois ROI, bien qu'elle soit plus lente pour le striatum. Ceci a pour effet un croisement des courbes du cortex et du striatum à la treizième minute. En effet, jusqu'à 12.5 minute, le cortex montre des valeurs SUV (pour « standardized uptake values ») supérieures au striatum. Il se produit alors un croisement des courbes et les valeurs SUV du striatum restent supérieures à celles du cortex pendant tout le reste de l'acquisition (Figure...).

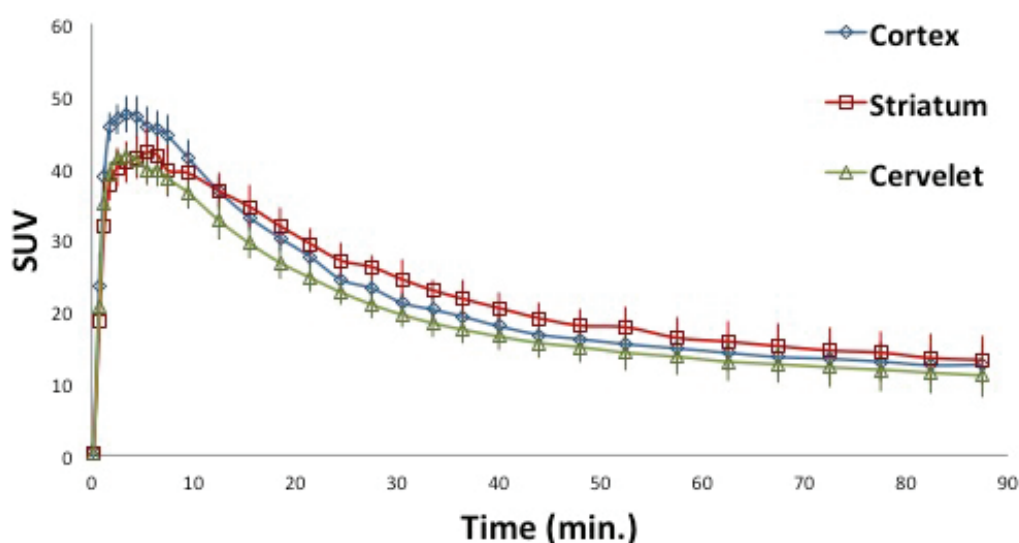
L'expérience de compétition a été réalisée par la pré-injection de 2FNQ1P (ligand froid) 10 minutes avant l'injection du [18F]2FNQ1P, à la dose de 1mg/kg. Il en résulte une diminution importante des valeurs SUV mesurées dans les trois ROI. La diminution la plus importante est observée dans le cortex, où la SUV est réduite à 0. Le cervelet montre aussi une diminution importante, tout comme le striatum, bien que pour cette région, l'ampleur de la baisse soit moins élevée (Figure 59). En effet, au moment du pic de radioactivité, la pré-injection de ligand froid provoque une chute de SUV de 100 % dans le cortex cingulaire, de 75.7 % dans le striatum et de 60.7 % dans le cervelet.



**Figure 59 :** Images TEP de la fixation du  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  recalées sur les images IRM du chat. Coupes : **A** sagittale, **B** coronale et **C** transversale. Courbes cinétiques de la radioactivité ( $\pm$  SD), comparaison entre le chat témoin et le chat pré-injecté avec du ligand froid (1 mg/kg). **Cx** : cortex, **Cg** : cortex cingulaire, **Cv** : cervelet, **Str** : striatum.

## b) Reproductibilité

Au total, 5 acquisitions au  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  ont été réalisées chez le même chat afin d'évaluer la reproductibilité, et ainsi estimer les SUV moyennes pour chaque ROI. Les SUV moyennes correspondent aux valeurs obtenues lors du premier examen. En effet, les  $\text{SUV}_{\text{max}}$  (SUV au moment du pic de radioactivité) de l'acquisition témoin sont de  $50.2 \pm 7.8$  pour le cortex cingulaire, de  $41.5 \pm 8.2$  pour le striatum et de  $43.0 \pm 9.9$  pour le cervelet. Les  $\text{SUV}_{\text{max}}$  moyennes sont respectivement de  $47.5 \pm 2.6$ , de  $42.1 \pm 4.1$  et de  $41.6 \pm 1.4$  (Figure 60).



**Figure 60 :** Courbes cinétiques moyennes de la radioactivité ( $\text{SUV} \pm \text{SD}$ ) en fonction du temps, chez le même chat ( $n = 5$ ).

## 5. Profil pharmacologique du $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$

Dans le but de déterminer le profil pharmacologique précis du radioligand  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$ , nous avons sous-traité à la CEREP des études de binding sur plusieurs récepteurs présents dans le système nerveux central. Les cibles étudiées sont les récepteurs adrénergiques  $\alpha_{1\text{B}}$ , les récepteurs dopaminergiques  $D_2$  et  $D_3$ , les récepteurs sérotoninergiques  $5\text{-HT}_{1\text{B}}$ ,  $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ ,  $5\text{-HT}_{2\text{C}}$  et  $5\text{-HT}_{4\text{e}}$ . Le  $[^{18}\text{F}]2\text{FNQ1P}$  ne présente aucune affinité pour ces différentes cibles, à tel point que les  $\text{IC}_{50}$  (concentration de  $2\text{FNQ1P}$  qui inhibe 50 % de la liaison d'un ligand de référence) n'ont pu être calculées. La seule composante dont l'affinité a été calculable est le récepteur  $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ . Ces résultats

montrent une affinité très faible du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P pour les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> avec un Ki à 0.26 μM et une IC<sub>50</sub> à 0.48 μM (Tableau 6).

Récepteur	IC <sub>50</sub> (μM)	Ki (μM)
α1B	-	-
D2	-	-
D3	-	-
5-HT1B	> 1,0	-
5-HT2B	0,48	0,26
5-HT2C	-	-
5-HT4e	-	-

**Tableau 6 :** Résumé des études de binding du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, réalisées sur plusieurs récepteurs cibles du système nerveux central.

## E. Discussion

### Sélection des radioligands antagonistes 5-HT<sub>6</sub> potentiels.

L'étape préalable aux études pharmacologiques présentées ici consistait à sélectionner les meilleurs antagonistes 5-HT<sub>6</sub> parmi l'ensemble des molécules synthétisées par l'équipe du laboratoire de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire UMR CNRS 5246 (travaux de thèse de Julie Colomb). Le choix des antagonistes 4FQ1P, 4FQ1PO et 2FNQ1P repose sur un équilibre constitué de 2 facteurs.

Le facteur primordial, qui a guidé le choix de ces trois ligands, est leur affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. En effet, sur les neuf molécules synthétisées, ce sont ces trois antagonistes qui présentent l'affinité la plus forte pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Le deuxième facteur concerne la synthèse organique de ces molécules. Car lorsque l'on parle d'imagerie TEP, les étapes de chimie organique, puis de radiochimie, sont fondamentales. Ainsi, le choix du 4FQNP paraissait évident, du fait de sa très forte affinité (K<sub>i</sub> 0.21 nM) et de son bon rendement de synthèse (62 %). Le 2FNQ1P dispose quant à lui d'un faible rendement de synthèse (16 %), mais sa bonne affinité (K<sub>i</sub> 0.9 nM) nous a conduit à le sélectionner. Enfin, le 4FQ1PO présente un rendement de synthèse médiocre (20 %), mais il garde une affinité suffisamment importante (K<sub>i</sub> 4.3 nM).

Comme il a été mentionné plus tôt, le radiomarquage des traceurs TEP potentiels est une étape décisive pour leur développement ultérieur. La qualité du radiomarquage est estimée par le rendement de radiosynthèse, calculé au moment de la production du fluor 18 (EOB pour « end of Beam »). Le [<sup>18</sup>F]4FQ1P a un bon rendement de 50 % EOB. Le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P possède un rendement inférieur, qui est de 30 % EOB. En revanche, le [<sup>18</sup>F]4FQ1PO a un très faible rendement à 1 % EOB.

Une fois que nous avons sélectionné nos radioligands potentiels, et après le succès de leur radiomarquage (bien que de faible rendement pour le [<sup>18</sup>F]4FQ1PO), nous avons précisé les caractéristiques de chacun d'entre eux, notamment leur sélectivité pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, vis-à-vis des 5-HT<sub>2A</sub>. En effet, ces derniers ont un pharmacophore proche de celui des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. C'est pourquoi les équipes qui cherchent à mettre au point un radiotracer 5-HT<sub>6</sub> testent régulièrement l'affinité de leurs molécules candidates pour les 5-HT<sub>2A</sub> (Liu, et al., 2011 ; Martarello, et al., 2005). Alors que le [<sup>18</sup>F]4FQ1P a une affinité 8.1 fois supérieure pour les 5-HT<sub>6</sub>, ce facteur est de 12.3 pour le

[<sup>18</sup>F]4FQ1PO. Le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P montre, lui, une très forte sélectivité, avec une affinité plus de 1000 fois supérieure pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, par rapport aux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>.

Une autre caractéristique essentielle des radiopharmaceutiques TEP est leur capacité à franchir la BHE. Pour estimer cette capacité, on utilise souvent la lipophilie, exprimée en LogD (coefficient de partition dans un mélange octanol/eau à pH 7.4). Nos trois radioligands ont un LogD compris entre 1.5 et 3.0, qui est la fourchette reconnue comme étant prédictive d'une bonne pénétration cérébrale (Eckelman et Mathis, 2006 ; Waterhouse, 2003). Cependant, il était nécessaire de confirmer les résultats obtenus par le calcul du LogD au moyen d'expériences *in vivo*. C'est pourquoi nous avons réalisé des acquisitions sur la caméra TEP EXACT ECAT HR+, dans le but de visualiser, chez le chat, l'accumulation intracérébrale de chacun des traceurs. Les résultats que nous avons obtenus ont confirmé que nos trois molécules candidates traversaient la BHE.

Les dernières données nécessaires à la sélection, parmi nos trois radioligands potentiels, du radiotracer dont nous allons poursuivre le développement, sont les autoradiographies *in vitro* sur coupes de cerveaux de rats. En effet, celles-ci sont importantes pour évaluer le profil pharmacologique de chacune des molécules, et bien sûr la spécificité de leur liaison.

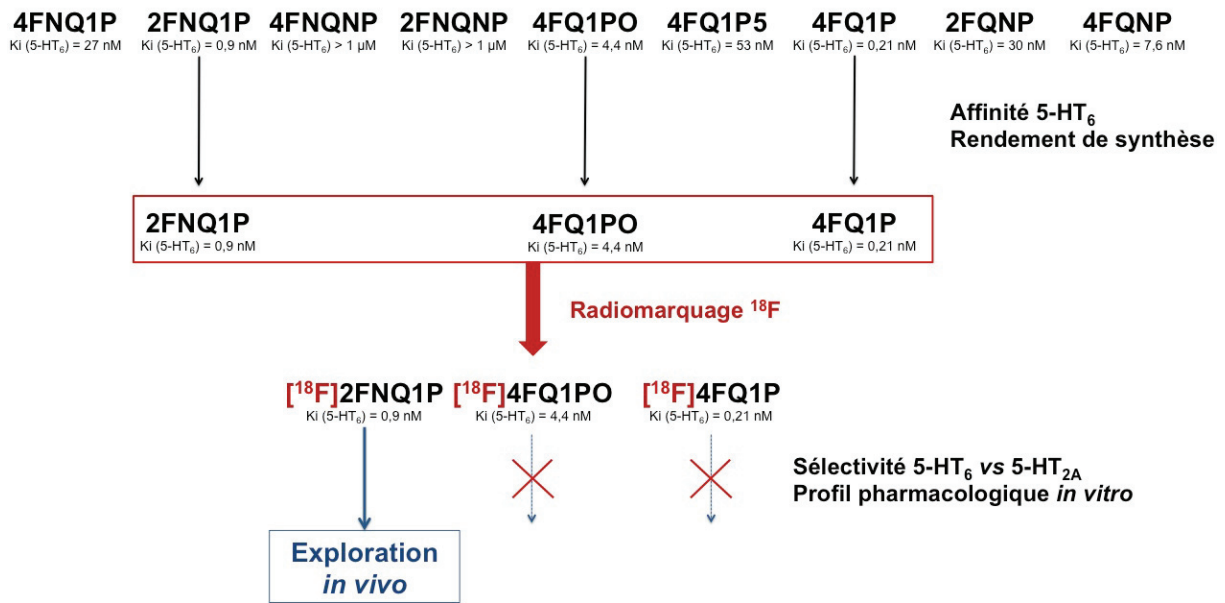
Ainsi, il apparaît que les trois radioligands fixent les structures d'intérêts riches en récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, avec au premier plan, un marquage intense dans le striatum, puis un marquage d'intensité moindre dans le cortex. Ces données sont en accord avec la distribution connue des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> chez le rat. Ceux-ci sont présents en forte densité dans les noyaux caudés, le putamen et le noyau accumbens, et en densité moins importante dans les structures corticales, notamment le cortex cingulaire (Roberts, et al., 2002). Pour ce qui est du [<sup>18</sup>F]4FQ1PO et du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, la liaison aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub> est sensible à la variation des concentrations de ligands, puisque l'ajout de ligand « froid » à 1 μM réduit fortement la fixation du radiotracer correspondant. Ce phénomène n'a pas été observé avec le [<sup>18</sup>F]4FQ1P car, malgré la présence de 4FQ1P à 1 μM, la fixation reste à 80 % du témoin. De plus, la spécificité de la liaison du [<sup>18</sup>F]4FQ1PO et du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P est prouvée par les expériences de compétition *in vitro*, réalisées avec l'antagoniste SB258585 spécifique des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Hirst, et al., 2000). Effectivement, l'ajout de concentrations croissantes de SB258585 dans les bains

d'autoradiographies déplace progressivement la fixation des radioligands. Celle-ci passe en dessous de la barre des 50 % de la radioactivité contrôle pour une concentration de 100 nM de SB258585. Encore une fois, le [<sup>18</sup>F]4FQ1P montre un profil pharmacologique différent des deux autres traceurs, car sa fixation dans le striatum n'est pas réversible, malgré l'ajout de fortes doses de SB258585.

Il semble donc que la liaison *in vitro* du [<sup>18</sup>F]4FQ1P manque de spécificité. Il faut rappeler que le 4FQ1P a la sélectivité 5-HT<sub>6</sub> versus 5-HT<sub>2A</sub> la plus faible des trois radioligands étudiés. En outre, les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sont localisés préférentiellement au niveau cortical ce qui correspond au marquage cortical intense du [<sup>18</sup>F]4FQ1P (Forutan, et al., 2002 ; Pazos, et al., 1987). Enfin, il faut noter que la structure chimique du 4FQ1P est très proche du radiotracer 5-HT<sub>6</sub> développé par les laboratoires GSK, le [<sup>11</sup>C]GSK215083. Ce dernier possède aussi une faible sélectivité 5-HT<sub>6</sub> versus 5-HT<sub>2A</sub> (Parker, et al., 2012). Toutes ces raisons nous ont convaincus de ne pas poursuivre nos investigations sur le [<sup>18</sup>F]4FQ1P.

Il nous restait alors à choisir entre le [<sup>18</sup>F]4FQ1PO et le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P. Bien que ces deux radioligands aient un profil *in vitro* similaire, le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P présente plusieurs avantages sur son concurrent. En effet, il a une affinité supérieure pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, avec un K<sub>i</sub> de 0.9 nM contre 4.4 nM pour le [<sup>18</sup>F]4FQ1PO. De plus, la très forte sélectivité de ce ligand pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, vis à vis des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, joue incontestablement en faveur du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P.

En résumé, le travail de sélection qui consistait, à partir de 9 molécules synthétisées, à choisir le meilleur radioligand potentiel, a abouti à l'élection du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P (Figure 61). Nous nous sommes attachés par la suite à caractériser le comportement *in vivo* de ce radiotracer.



**Figure 61** : Schéma résumant la démarche de sélection du radiotracer 5-HT<sub>6</sub> candidat.

### Imagerie TEP *in vivo* au [<sup>18</sup>F]2FNQ1P.

Nous avons déjà mentionné la nécessité, pour un radiopharmaceutique TEP cérébral, de traverser la BHE. En ce qui concerne le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, nous avons vu que, chez le chat, l'injection intraveineuse permettait une accumulation cérébrale compatible avec un examen TEP. Malgré cela, il est important de noter une forte variabilité inter-espèces dans ce domaine. En effet, la réalisation d'un examen  $\mu$ TEP chez le rat, montre l'absence totale d'accumulation intracérébrale du traceur. Cependant, lorsque le rat est pré-injecté avec de la ciclosporine à la dose de 50 mg/kg, dose reconnue comme inhibitrice des glycoprotéines P (PgP) (pour revue Ishiwata, et al., 2007), l'accumulation intracérébrale du traceur a lieu de façon flagrante (Figure 58). Ces PgP sont des protéines d'efflux qui ont pour fonction d'extraire du flux sanguin cérébral un grand nombre de composés endogènes ou de xénobiotiques. Il semble donc que, chez le rat, le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P soit un substrat des PgP.

Le fait d'être un substrat des PgP pourrait être un frein important au développement du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P. Ceci dit, le rat est connu pour être un animal chez qui l'expression des PgP est naturellement très élevée. De plus, le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P passe la BHE chez le chat. Ces données nous poussent à remettre en question le modèle de rat, tant dans les explorations fonctionnelles réalisées au moyen de l'imagerie TEP que dans l'évaluation pharmacologique *in vivo* de radiotraceurs.



Pour cette raison, nous avons évalué le comportement *in vivo* de notre radiotracer [18F]2FNQ1P chez le chat, avec la caméra TEP Biograph mCT haute résolution (Siemens).

Il apparaît que notre radiotracer [18F]2FNQ1P a la capacité d'imager *in vivo* les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, car les structures d'intérêt riches de ces récepteurs ressortent particulièrement marquées. En effet, le striatum, qui est la structure cérébrale la plus densément peuplée en récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, se révèle fortement fixée par le [18F]2FNQ1P.

Cependant, on note une intensité de fixation du [18F]2FNQ1P supérieure dans le cortex cingulaire. Cette donnée est en contradiction avec les connaissances actuelles sur la distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, car bien qu'ils soient présents en quantité importante dans certaines structures corticales, la densité au sein de ces structures est inférieure à celle du striatum. Néanmoins, il est vrai que les données de la littérature concernant la distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> chez le chat sont presque inexistantes. L'étude réalisée par Tang *et coll.* dans notre laboratoire avait tenté une première exploration TEP *in vivo* chez le chat, mais les résultats furent décevants en raison du manque de spécificité du traceur (Tang, et al., 2007). Les autres équipes qui se sont attachées au développement d'un radiotracer 5-HT<sub>6</sub> n'ont pas utilisé le modèle chat. Parker *et al.* ont étudié plusieurs modèles qui ont montré une accumulation cortical intense, bien qu'inférieure à l'accumulation striatale (Parker, et al., 2012). Malgré cela, il semble difficile de confronter nos résultats avec des données existantes pour comprendre si nos images reflètent une composante pharmacologique inconnue de notre traceur ou une distribution différente des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> chez le chat.

Enfin, les images que nous avons obtenues, et plus encore les courbes cinétiques, montrent une accumulation du [18F]2FNQ1P dans le cervelet. Or ce dernier est réputé être dénué de récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Roberts, et al., 2002). Cependant, malgré le faible taux d'ARNm issu du gène HTR6 dans le cervelet (Ward, et al., 1995), certains auteurs ont rapporté un immunomarquage important du cervelet par un anticorps spécifique des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Gerard, et al., 1997). Là encore, il nous est difficile d'affirmer que notre traceur révèle une variabilité inter-espèces dans la distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, ou si c'est un manque de sélectivité qui provoque ce marquage intense dans le cervelet.

De façon analogue aux tests que nous avons réalisés *in vitro*, nous avons évalué la sensibilité du [18F]2FNQ1P aux variations de la quantité de ligand « froid ». Cette

expérience montre que la liaison du [ $^{18}\text{F}$ ]2FNQ1P est déplacée par la pré-injection de 1mg/kg de 2FNQ1P. Ceci révèle la réversibilité de la liaison de notre traceur. Il est intéressant de constater que pour la même dose de ligand « froid » pré-injecté, le signal dans le cortex cingulaire chute totalement, alors qu'il en reste près de 25 % dans le striatum et 40 % dans le cervelet. Selon nous, il est probable que le signal ait été totalement effacé dans ces deux régions si nous avions pré-injecté une dose plus forte de 2FNQ1P. Cependant, nous n'avons pas fait ces pré-injections à doses supérieures en raison d'effets dépressifs du 2FNQ1P sur le système cardio-vasculaire. En effet, dès la dose de 1 mg/kg, le 2FNQ1P provoque une chute importante et brutale de la fréquence cardiaque du chat.

Une autre étape fondamentale dans la validation d'un radiotraceur TEP concerne la reproductibilité, notamment en vue de la quantification. Dans la mesure où nous ne disposons pas, au CERMEP, d'atlas numérique de chat (réalisé en moyennant plusieurs IRM de chat) permettant un recalage standardisé des images TEP, nous n'avons pas pu réaliser les expériences de test-retest classiquement utilisées pour mesurer cette reproductibilité. Cependant, afin d'évaluer cette reproductibilité, nous avons réalisé un total de cinq acquisitions chez le même chat, avec au minimum 5 jours d'intervalle entre chacune d'elles. La moyenne des SUV de toutes ces acquisitions montre des valeurs très proches de la première acquisition témoin que nous avons réalisée. De plus les écart-types de la moyenne des cinq courbes cinétiques sont très faibles. L'ensemble de ces résultats suggère une bonne reproductibilité des mesures de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]2FNQ1P.

Pour finir, afin de déterminer si le schéma de distribution du [ $^{18}\text{F}$ ]2FNQ1P reflète un manque de spécificité de sa liaison aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, nous avons sous-traité à la CEREP ([www.cerep.com](http://www.cerep.com)) le calcul de l'affinité de notre traceur pour différents récepteurs cérébraux. Nous avons sélectionné des cibles classiquement étudiées par les équipes qui s'intéressent aux ligands 5-HT<sub>6</sub>, en raison de leur proximité topographique (récepteur dopaminergique D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) ou de leur analogie structurale (récepteur monoaminergique) (Hirst, et al., 2000 ; Parker, et al., 2012). Le profil de liaison de notre traceur montre clairement une très grande sélectivité envers les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, avec seulement une très faible affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub>. A cette faible affinité s'ajoute le fait que les récepteurs 5-HT<sub>2B</sub> sont peu présents dans le cerveau, et seulement

dans un nombre restreint de structures (pour revue Hoyer, et al., 2002). Ainsi, il est peu probable que l'ensemble des récepteurs que nous avons étudié interfère dans l'interprétation de nos données d'imagerie.

## **Perspectives**

Les travaux que nous avons réalisés en collaboration étroite avec le laboratoire de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (UMR CNRS 5246) nous ont permis de sélectionner et de caractériser un nouveau radioligand des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P. Afin de valider définitivement le [<sup>18</sup>F]2FNQ1P comme un radiopharmaceutique, utilisable pour des études longitudinales chez des patients atteints de maladies neurodégénératives, ou des études de « drug occupancy », certaines investigations restent nécessaires.

Il s'agit notamment de réaliser des études de compétition *in vivo* avec un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. En effet, un déplacement de la liaison du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P, analogue à celui que nous avons obtenu avec la pré-injection de ligand « froid », provoqué par l'injection d'un antagoniste est indispensable pour s'assurer de la spécificité du marquage *in vivo*. Or pour le moment, les expériences préliminaires d'injection de SB258585 n'ont pas permis d'obtenir des déplacements de la liaison du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P.

Une deuxième série d'études à entreprendre concerne la quantification précise de la liaison du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P. Cela comprend notamment la réalisation de fonctions d'entrées avec prélèvements sanguins dans le but de déterminer la métabolisation du traceur. Ces données sont nécessaires pour établir un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique et ainsi obtenir les constantes caractéristiques du ligand. Celles-ci sont indispensables à la quantification de la fixation du radioligand : le B<sub>max</sub> (concentration maximal de récepteur), le K<sub>d</sub> (affinité du ligand pour le récepteur) et le V<sub>d</sub> (volume de distribution).

Enfin, cette étude ayant pour finalité le passage à l'homme, il est obligatoire d'effectuer une étude de dosimétrie du [<sup>18</sup>F]2FNQ1P. Les informations concernant les doses et les débits de doses reçus par les différents organes en fonction de la quantité de radiotraceur injectée, sont demandées par les agences sanitaires (française, européenne, américaine) et les comités d'éthiques qui autorisent les investigations cliniques chez l'Homme.

## IV. Conclusion générale

Les travaux décrits dans ce mémoire de thèse s'inscrivent dans le cadre de la recherche et de l'innovation en imagerie biomédical. Ils se situent à l'interface des sciences fondamentales et de la recherche clinique hospitalière réalisée aux hospices civils de Lyon. Cette recherche translationnelle vise à apporter des bénéfices directs aux patients, par l'utilisation de tissus biologiques, analysés grâce aux connaissances apportées par la recherche fondamentale.

Notre domaine d'investigation, l'imagerie cérébrale, a bénéficié depuis plus d'une décennie de moyens importants pour améliorer les techniques actuelles en augmentant la sensibilité ainsi que la précision des mesures. Ces efforts ont permis des avancées quantitatives, tant pour l'imagerie TEP que IRM, avec des résolutions de plus en plus fines et précises. Récemment, les évolutions technologiques ont permis la mise au point de caméras hybrides IRM-TEP, dont les acquisitions peuvent être faites dans le même espace et de façon simultanée. Un autre aspect, largement exploité de nos jours, consiste à mettre au point des agents d'imagerie multimodaux. Ceux-ci sont considérés comme tels lorsqu'ils permettent, dans les mêmes conditions, les deux types d'acquisition, TEP et IRM. Bien qu'aucun véritable agent d'imagerie multimodal TEP-IRM n'a encore vu le jour (notamment en raison de sensibilités de détection très distinctes), de nombreuses équipes y travaillent, notamment pour leurs utilisations potentielles sur les nouvelles caméras hybrides.

Nous avons choisi une approche différente, bien que complémentaire. En effet, grâce à l'utilisation de concepts pharmacologiques inédits pour l'imagerie, nous avons tenté d'effectuer un saut qualitatif quant aux données d'imagerie. Les nouveaux agents pharmacologiques, tel que l'agoniste 5-HT<sub>1A</sub> F15599, peuvent servir à la fois dans des études TEP (à dose traceuse) et IRM<sub>f</sub> (à dose pharmacologique). Ainsi, ils apportent des informations fonctionnelles et spécifiques en discriminant des régions cérébrales ou des réseaux de neurotransmission. Ces ligands de nouvelle génération pourraient permettre, à terme, une finesse dans l'action pharmacologique cérébrale ainsi qu'une imagerie prenant réellement en compte les récepteurs fonctionnels (donc pharmacologiquement actifs).

## V. Annexes

### A. Annexe 1

#### Critères diagnostiques de la démence de type Alzheimer. DSM-IV-TR

A. Apparition de déficits cognitifs multiples, comme en témoignent à la fois :

1. une altération de la mémoire (altération de la capacité à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement)
2. une (ou plusieurs) des perturbations cognitives suivantes :
  - a. aphasie (perturbation du langage)
  - b. apraxie (altération de la capacité à réaliser une activité motrice malgré des fonctions motrices intactes)
  - c. agnosie (impossibilité de reconnaître ou d'identifier des objets malgré des fonctions sensorielles intactes)
  - d. perturbation des fonctions exécutives (faire des projets, organiser, ordonner dans le temps, avoir une pensée abstraite).

B. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 sont tous les deux à l'origine d'une altération significative du fonctionnement social ou professionnel et représentent un déclin significatif par rapport au niveau de fonctionnement antérieur.

C. L'évolution est caractérisée par un début progressif et un déclin cognitif continu.

D. Les déficits cognitifs des critères A1 et A2 ne sont pas dus :

1. à d'autres affections du système nerveux central qui peuvent entraîner des déficits progressifs de la mémoire et du fonctionnement cognitif (par exemple : maladie cérébro-vasculaire, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, hématome sous dural, hydrocéphalie à pression normale, tumeur cérébrale)
2. à des affections générales pouvant entraîner une démence (par exemple : hypothyroïdie, carence en vitamine B12 ou en folates, pellagre, hypercalcémie, neurosyphilis, infection par le VIH)
3. à des affections induites par une substance.

E. Les déficits ne surviennent pas de façon exclusive au cours de l'évolution d'un syndrome confusionnel.

F. La perturbation n'est pas mieux expliquée par un trouble de l'Axe I (par exemple : trouble dépressif majeur, schizophrénie).

Codification fondée sur la présence ou l'absence d'une perturbation cliniquement significative du comportement :

**Sans perturbation du comportement** : si les troubles cognitifs ne s'accompagnent d'aucune perturbation cliniquement significative du comportement.

**Avec perturbation du comportement** : si les troubles cognitifs s'accompagnent d'une perturbation cliniquement significative (par exemple : errance, agitation) du comportement.

Préciser le sous-type :

**À début précoce** : si le début se situe à 65 ans ou avant.

**À début tardif** : si le début se situe après 65 ans.

## B. Annexe 2

### Critères de diagnostic de la maladie d'Alzheimer. NINCDS-ADRDA

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 habilités 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.

## VI. Bibliographie

(1997). Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of aging* 18, S1-2.

Absher J. and Cummings J. (1993). Non cognitive behavioral alterations in dementia syndromes. In *Handbook of neuropsychology*, F. Boller and J. Grafman, eds. (Elsevier Science Publishers), pp. 315-338.

Agdeppa E. D., Kepe V., Liu J., Flores-Torres S., Satyamurthy N., Petric A., Cole G. M., Small G. W., Huang S. C. and Barrio J. R. (2001). Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, RC189.

Albert M. S., DeKosky S. T., Dickson D., Dubois B., Feldman H. H., Fox N. C., Gamst A., Holtzman D. M., Jagust W. J., Petersen R. C., et al. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7, 270-279.

Albert P. R., Zhou Q. Y., Van Tol H. H., Bunzow J. R. and Civelli O. (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 265, 5825-5832.

Alperovitch A., Amouyel P., Dartigues J. F., Ducimetiere P., Mazoyer B., Ritchie K. and Tzourio C. (2002). [Epidemiological studies on aging in France: from the PAQUID study to the Three-City study]. *Comptes rendus biologies* 325, 665-672.

Altieri S. C., Garcia-Garcia A. L., Leonardo E. D. and Andrews A. M. (2013). Rethinking 5-HT<sub>1A</sub> receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS chemical neuroscience* 4, 72-83.

Andrade R. and Haj-Dahmane S. (2013). Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. *ACS chemical neuroscience* 4, 22-25.

Annaert W., Cupers P., Saftig P. and De Strooper B. (2000). Presenilin function in APP processing. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920, 158-164.

Apostolova L. G., Dinov I. D., Dutton R. A., Hayashi K. M., Toga A. W., Cummings J. L. and Thompson P. M. (2006). 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 129, 2867-2873.



Arthurs O. J. and Boniface S. (2002). How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends in neurosciences* 25, 27-31.

Arvidsson L. E., Hacksell U., Nilsson J. L., Hjorth S., Carlsson A., Lindberg P., Sanchez D. and Wikstrom H. (1981). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry* 24, 921-923.

Assal F. and Cummings J. L. (2002). Neuropsychiatric symptoms in the dementias. *Current opinion in neurology* 15, 445-450.

Assie M. B., Bardin L., Auclair A. L., Carilla-Durand E., Depoortere R., Koek W., Kleven M. S., Colpaert F., Vacher B. and Newman-Tancredi A. (2010). F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT(1A) receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 1285-1298.

Assie M. B., Lomenech H., Ravailhe V., Faucillon V. and Newman-Tancredi A. (2006). Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT1A receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT1A agonist, F13714: a microdialysis study in the rat. *British journal of pharmacology* 149, 170-178.

Aznavour N., Rbah L., Leger L., Buda C., Sastre J. P., Imhof A., Charnay Y. and Zimmer L. (2006). A comparison of in vivo and in vitro neuroimaging of 5-HT 1A receptor binding sites in the cat brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 31, 226-232.

Aznavour N. and Zimmer L. (2007). [18F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT1A receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology* 52, 695-707.

Bakchine S., Lacomblez L., Palisson E., Laurent M. and Derouesne C. (1989). Relationship between primitive reflexes, extra-pyramidal signs, reflective apraxia and severity of cognitive impairment in dementia of the Alzheimer type. *Acta neurologica Scandinavica* 79, 38-46.

Bakchine S. and Loft H. (2008). Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled 6-month study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 13, 97-107.

Baker K. G., Halliday G. M. and Tork I. (1990). Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *The Journal of comparative neurology* 301, 147-161.

Bard J. A., Zgombick J., Adham N., Vaysse P., Branchek T. A. and Weinshank R. L. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *The Journal of biological chemistry* 268, 23422-23426.

Baron J. C., Chetelat G., Desgranges B., Perchey G., Landeau B., de la Sayette V. and Eustache F. (2001). In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *NeuroImage* 14, 298-309.

Bennett D. A., Schneider J. A., Arvanitakis Z., Kelly J. F., Aggarwal N. T., Shah R. C. and Wilson R. S. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66, 1837-1844.

Bentley J. C., Bourson A., Boess F. G., Fone K. C., Marsden C. A., Petit N. and Sleight A. J. (1999). Investigation of stretching behaviour induced by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790, in rats. *British journal of pharmacology* 126, 1537-1542.

Berti V., Osorio R. S., Mosconi L., Li Y., De Santi S. and de Leon M. J. (2010). Early detection of Alzheimer's disease with PET imaging. *Neuro-degenerative diseases* 7, 131-135.

Bettens K., Slegers K. and Van Broeckhoven C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet neurology* 12, 92-104.

Blacker D., Haines J. L., Rodes L., Terwedow H., Go R. C., Harrell L. E., Perry R. T., Bassett S. S., Chase G., Meyers D., et al. (1997). ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative. *Neurology* 48, 139-147.

Blennow K. and Hampel H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet neurology* 2, 605-613.

Blennow K., Hampel H., Weiner M. and Zetterberg H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology* 6, 131-144.

Blier P. and Ward N. M. (2003). Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in the treatment of depression? *Biological psychiatry* 53, 193-203.

Bliss T. V. and Collingridge G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Blom E. S., Giedraitis V., Zetterberg H., Fukumoto H., Blennow K., Hyman B. T., Irizarry M. C., Wahlund L. O., Lannfelt L. and Ingelsson M. (2009). Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon<sub>4</sub>/epsilon<sub>4</sub> genotype. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 27, 458-464.

Boess F. G., Riemer C., Bos M., Bentley J., Bourson A. and Sleight A. J. (1998). The 5-hydroxytryptamine<sub>6</sub> receptor-selective radioligand [<sup>3</sup>H]Ro 63-0563 labels 5-hydroxytryptamine receptor binding sites in rat and porcine striatum. *Molecular pharmacology* 54, 577-583.

Bohnen N. I., Djang D. S., Herholz K., Anzai Y. and Minoshima S. (2012). Effectiveness and safety of 18F-FDG PET in the evaluation of dementia: a review of the recent literature. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53, 59-71.

Bouet V., Klomp A., Freret T., Wylezinska-Arridge M., Lopez-Tremoleda J., Dauphin F., Boulouard M., Booi J., Gsell W. and Reneman L. (2011). Age-dependent effects of chronic fluoxetine treatment on the serotonergic system one week following treatment. *Psychopharmacology*.

Bourson A., Borroni E., Austin R. H., Monsma F. J., Jr. and Sleight A. J. (1995). Determination of the role of the 5-HT<sub>6</sub> receptor in the rat brain: a study using antisense oligonucleotides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274, 173-180.

Bowen D. M., Najlerahim A., Procter A. W., Francis P. T. and Murphy E. (1989). Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9504-9508.

Braak E., Braak H. and Mandelkow E. M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta neuropathologica* 87, 554-567.

Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82, 239-259.

Braak H. and Braak E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of aging* 18, 351-357.

Branchek T. A. and Blackburn T. P. (2000). 5-HT<sub>6</sub> receptors as emerging targets for drug discovery. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40, 319-334.

Bromidge S. M., Brown A. M., Clarke S. E., Dodgson K., Gager T., Grassam H. L., Jeffrey P. M., Joiner G. F., King F. D., Middlemiss D. N., et al. (1999). 5-Chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-yl-phenyl)-3-methyl-2-benzothiophenesulfonamide (SB-271046): a potent, selective, and orally bioavailable 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *Journal of medicinal chemistry* 42, 202-205.

Brunden K. R., Trojanowski J. Q. and Lee V. M. (2008). Evidence that non-fibrillar tau causes pathology linked to neurodegeneration and behavioral impairments. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 14, 393-399.

Brunden K. R., Trojanowski J. Q. and Lee V. M. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews Drug discovery* 8, 783-793.

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

Buerger K., Ewers M., Pirttila T., Zinkowski R., Alafuzoff I., Teipel S. J., DeBernardis J., Kerkman D., McCulloch C., Soininen H., et al. (2006). CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 129, 3035-3041.

Buritova J., Berrichon G., Cathala C., Colpaert F. and Cussac D. (2009). Region-specific changes in 5-HT<sub>1A</sub> agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study. *Neuropharmacology* 56, 350-361.

Burnham S. C., Faux N. G., Wilson W., Laws S. M., Ames D., Bedo J., Bush A. I., Doecke J. D., Ellis K. A., Head R., et al. (2013). A blood-based predictor for neocortical Aβ burden in Alzheimer's disease: results from the AIBL study. *Molecular psychiatry*.

Canese R., Marco E. M., De Pasquale F., Podo F., Laviola G. and Adriani W. (2011). Differential response to specific 5-HT<sub>7</sub> versus whole-serotonergic drugs in rat forebrains: a pHMRI study. *NeuroImage* 58, 885-894.

Cardebat D., Aithamon B. and Puel M. (1995). Les troubles du langage dans les démences de type Alzheimer. In *Neuropsychologie clinique des démences : évaluation et prise en charge*, M. Editions Solal, ed. (Eustache, F. Agniel, A.), pp. 213-223.

Carli M., Bonalumi P. and Samanin R. (1997). WAY 100635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal administration of scopolamine or 7-chloro-kynurenic acid. *Brain research* 774, 167-174.

Carli M., Lazarova M., Tatarczynska E. and Samanin R. (1992). Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus impairs acquisition and performance of a spatial task in a water maze. *Brain research* 595, 50-56.

Carli M., Prontera C. and Samanin R. (1989). Effect of 5-HT<sub>1A</sub> agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology* 28, 471-476.

Carli M. and Samanin R. (1992). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin impairs spatial learning in a water maze: role of postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *British journal of pharmacology* 105, 720-726.

Casanovas J. M., Vilaro M. T., Mengod G. and Artigas F. (1999). Differential regulation of somatodendritic serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors by 2-week treatments with the selective agonists alnespirone (S-20499) and 8-hydroxy-2-(Di-n-propylamino)tetralin: microdialysis and autoradiographic studies in rat brain. *Journal of neurochemistry* 72, 262-272.

Chang W. P., Koelsch G., Wong S., Downs D., Da H., Weerasena V., Gordon B., Devasamudram T., Bilcer G., Ghosh A. K., et al. (2004). In vivo inhibition of Aβ production by memapsin 2 (β-secretase) inhibitors. *Journal of neurochemistry* 89, 1409-1416.

Charnay Y. and Leger L. (2010). Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in clinical neuroscience* 12, 471-487.

Chen C. P., Alder J. T., Bowen D. M., Esiri M. M., McDonald B., Hope T., Jobst K. A. and Francis P. T. (1996). Presynaptic serotonergic markers in community-acquired cases of Alzheimer's disease: correlations with depression and neuroleptic medication. *Journal of neurochemistry* 66, 1592-1598.

Chen C. P., Eastwood S. L., Hope T., McDonald B., Francis P. T. and Esiri M. M. (2000). Immunocytochemical study of the dorsal and median raphe nuclei in patients with Alzheimer's disease prospectively assessed for behavioural changes. *Neuropathology and applied neurobiology* 26, 347-355.

Chen Y., Wan H. I., O'Reardon J. P., Wang D. J., Wang Z., Korczykowski M. and Detre J. A. (2011). Quantification of cerebral blood flow as biomarker of drug effect: arterial spin labeling phMRI after a single dose of oral citalopram. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89, 251-258.

Chetelat G., Landeau B., Eustache F., Mezenge F., Viader F., de la Sayette V., Desgranges B. and Baron J. C. (2005). Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *NeuroImage* 27, 934-946.

Choi S. R., Golding G., Zhuang Z., Zhang W., Lim N., Hefti F., Benedum T. E., Kilbourn M. R., Skovronsky D. and Kung H. F. (2009). Preclinical properties of 18F-AV-45: a PET agent for Abeta plaques in the brain. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50, 1887-1894.

Chui H. C., Lyness S. A., Sobel E. and Schneider L. S. (1994). Extrapyramidal signs and psychiatric symptoms predict faster cognitive decline in Alzheimer's disease. *Archives of neurology* 51, 676-681.

Cirrito J. R., Disabato B. M., Restivo J. L., Verges D. K., Goebel W. D., Sathyan A., Hayreh D., D'Angelo G., Benzinger T., Yoon H., et al. (2011). Serotonin signaling is associated with lower amyloid-beta levels and plaques in transgenic mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14968-14973.

Clawges H. M., Depree K. M., Parker E. M. and Graber S. G. (1997). Human 5-HT1 receptor subtypes exhibit distinct G protein coupling behaviors in membranes from Sf9 cells. *Biochemistry* 36, 12930-12938.

Cliffe I. A., Brightwell C. I., Fletcher A., Forster E. A., Mansell H. L., Reilly Y., Routledge C. and White A. C. (1993). (S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide [(S)-WAY-100135]: a selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT1A receptors. *Journal of medicinal chemistry* 36, 1509-1510.

Codony X., Vela J. M. and Ramirez M. J. (2011). 5-HT(6) receptor and cognition. *Current opinion in pharmacology* 11, 94-100.

Coleman R. E. (2005). Positron emission tomography diagnosis of Alzheimer's disease. *Neuroimaging clinics of North America* 15, 837-846, x.

Comley R. A., Salinas C., Mizrahi R., Vitcu I., Ng A., Hallett W., Keat N., Wilson A. A., Rabiner E. A., Laruelle M., et al. (2012). Biodistribution and radiation dosimetry of the serotonin 5-HT<sub>6</sub> ligand [(1)(1)C]GSK215083 determined from human whole-body PET. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 14, 517-521.

Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L. and Pericak-Vance M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.

Costes N. and Reilhac A. (2006). Evaluation of PET tracer binding recovered by partial volume correction technique in case of hippocampic atrophy. *IEEE Nuclear Science Symposium & Medical imaging Conference*.

Croisile B., Brabant M. J., Carmoi T., Lepage Y., Aimard G. and Trillet M. (1996). Comparison between oral and written spelling in Alzheimer's disease. *Brain and language* 54, 361-387.

Cross A. J., Crow T. J., Ferrier I. N. and Johnson J. A. (1986). The selectivity of the reduction of serotonin S<sub>2</sub> receptors in Alzheimer-type dementia. *Neurobiology of aging* 7, 3-7.

Cummings J. L. (2004). Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 351, 56-67.

Cussac D., Duqueyroy D., Newman-Tancredi A. and Millan M. J. (2002). Stimulation by antipsychotic agents of mitogen-activated protein kinase (MAPK) coupled to cloned, human (h)serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> receptors. *Psychopharmacology* 162, 168-177.

D'Amato R. J., Zweig R. M., Whitehouse P. J., Wenk G. L., Singer H. S., Mayeux R., Price D. L. and Snyder S. H. (1987). Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Annals of neurology* 22, 229-236.

Da Silva Costa V., Duchatelle P., Boulouard M. and Dauphin F. (2009). Selective 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade improves spatial recognition memory and reverses age-related deficits in spatial recognition memory in the mouse. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34, 488-500.

Da Silva Costa-Aze V., Quiedeville A., Boulouard M. and Dauphin F. (2012). 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice. *Psychopharmacology* 222, 99-115.

Dahlstrom A. and Fuxe K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.

Dalgliesh C. E., Toh C. C. and Work T. S. (1953). Fractionation of the smooth muscle stimulants present in extracts of gastro-intestinal tract. Identification of 5-hydroxytryptamine and its distinction from substance P. *The Journal of physiology* 120, 298-310.

Davis K. L., Mohs R. C., Marin D., Purohit D. P., Perl D. P., Lantz M., Austin G. and Haroutunian V. (1999). Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 281, 1401-1406.

De Leon M. J., George A. E., Golomb J., Tarshish C., Convit A., Kluger A., De Santi S., McRae T., Ferris S. H., Reisberg B., et al. (1997). Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 18, 1-11.

De Vivo M. and Maayani S. (1986). Characterization of the 5-hydroxytryptamine<sub>1a</sub> receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 238, 248-253.

DeKosky S. T., Ikonomic M. D., Styren S. D., Beckett L., Wisniewski S., Bennett D. A., Cochran E. J., Kordower J. H. and Mufson E. J. (2002). Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Annals of neurology* 51, 145-155.

Delacourte A., David J. P., Sergeant N., Buee L., Wattez A., Vermersch P., Ghzali F., Fallet-Bianco C., Pasquier F., Lebert F., et al. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158-1165.

Depoortere R., Auclair A. L., Bardin L., Colpaert F. C., Vacher B. and Newman-Tancredi A. (2010). F15599, a preferential post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist: activity in models of cognition in comparison with reference 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 20, 641-654.

Derouesne C., Poitreneau J., Hugonot L., Kalafat M., Dubois B. and Laurent B. (1999). [Mini-Mental State Examination: a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. Consensual French version]. *Presse Med* 28, 1141-1148.

Descarries L. and Mechawar N. (2000). Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Progress in brain research* 125, 27-47.

Descarries L., Watkins K. C., Garcia S. and Beaudet A. (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *The Journal of comparative neurology* 207, 239-254.

Deweere B., Lehericy S., Pillon B., Baulac M., Chiras J., Marsault C., Agid Y. and Dubois B. (1995). Memory disorders in probable Alzheimer's disease: the role of hippocampal atrophy as shown with MRI. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 58, 590-597.

Dompert W. U., Glaser T. and Traber J. (1985). 3H-TVX Q 7821: identification of 5-HT<sub>1</sub> binding sites as target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 328, 467-470.

Dubois B. (2000). 'Prodromal Alzheimer's disease': a more useful concept than mild cognitive impairment? *Current opinion in neurology* 13, 367-369.

Dubois B. and Albert M. L. (2004). Amnesic MCI or prodromal Alzheimer's disease? *Lancet neurology* 3, 246-248.

Dubois B., Feldman H. H., Jacova C., Cummings J. L., Dekosky S. T., Barberger-Gateau P., Delacourte A., Frisoni G., Fox N. C., Galasko D., et al. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet neurology* 9, 1118-1127.

Dubois B., Feldman H. H., Jacova C., Dekosky S. T., Barberger-Gateau P., Cummings J., Delacourte A., Galasko D., Gauthier S., Jicha G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet neurology* 6, 734-746.

Dumuis A., Sebben M. and Bockaert J. (1988). Pharmacology of 5-hydroxytryptamine-1A receptors which inhibit cAMP production in hippocampal and cortical neurons in primary culture. *Molecular pharmacology* 33, 178-186.

Dupuis D. S., Mannoury la Cour C., Chaput C., Verrielle L., Lavielle G. and Millan M. J. (2008). Actions of novel agonists, antagonists and antipsychotic agents at recombinant rat 5-HT<sub>6</sub> receptors: a comparative study of coupling to G<sub>α</sub>s. *European journal of pharmacology* 588, 170-177.

Duvernoy H. M., Cattin F., Fatterpekar G., Naidich T., Raybaud C., Risold P. Y., Salvolini U. and Scarabino T. (2005). *The Human Hippocampus*, Thier edition edn (Springer).

Duyckaerts C. (2004). Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiology of aging* 25, 735-739; discussion 743-736.

Duyckaerts C., Benecib M., Grignon Y., Uchihara T., He Y., Piette F. and Hauw J. J. (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiology of aging* 18, 267-273.

Duyckaerts C., Colle M. A., Dessi F., Piette F. and Hauw J. J. (1998a). Progression of Alzheimer histopathological changes. *Acta neurologica Belgica* 98, 180-185.



Duyckaerts C., Colle M. A., Seilhean D. and Hauw J. J. (1998b). Laminar spongiosis of the dentate gyrus: a sign of disconnection, present in cases of severe Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* 95, 413-420.

East S. Z., Burnet P. W., Leslie R. A., Roberts J. C. and Harrison P. J. (2002). 5-HT<sub>6</sub> receptor binding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: autoradiographic studies with [<sup>125</sup>I]SB-258585. *Synapse* 45, 191-199.

Echavarri C., Burgmans S., Uylings H., Cuesta M. J., Peralta V., Kamphorst W., Rozemuller A. J. and Verhey F. R. (2013). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 33, 715-721.

Echeverria V., Ducatenzeiler A., Dowd E., Janne J., Grant S. M., Szyf M., Wandosell F., Avila J., Grimm H., Dunnett S. B., et al. (2004). Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience* 129, 583-592.

Eckelman W. C. and Mathis C. A. (2006). Targeting proteins in vivo: in vitro guidelines. *Nuclear medicine and biology* 33, 161-164.

el Mestikawy S., Riad M., Laporte A. M., Verge D., Daval G., Gozlan H. and Hamon M. (1990). Production of specific anti-rat 5-HT<sub>1A</sub> receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neuroscience letters* 118, 189-192.

Emerit M. B., el Mestikawy S., Gozlan H., Rouot B. and Hamon M. (1990). Physical evidence of the coupling of solubilized 5-HT<sub>1A</sub> binding sites with G regulatory proteins. *Biochemical pharmacology* 39, 7-18.

Eriksson T. M., Golkar A., Ekstrom J. C., Svenningsson P. and Ogren S. O. (2008). 5-HT<sub>7</sub> receptor stimulation by 8-OH-DPAT counteracts the impairing effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation on contextual learning in mice. *European journal of pharmacology* 596, 107-110.

Erspamer V. (1946). *Experientia* 2, 369-371.

Etminan M., Gill S. and Samii A. (2003). Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* 327, 128.

Eustache F. and Desgranges B. (1995). La mémoire à long terme dans la maladie d'Alzheimer. In *Neuropsychologie clinique des démences : évaluation et prise en charge*, M. Editions Solal, ed. (Eustache, F. Agniel, A.), pp. 183-197.

Fagan A. M., Mintun M. A., Mach R. H., Lee S. Y., Dence C. S., Shah A. R., LaRossa G. N., Spinner M. L., Klunk W. E., Mathis C. A., et al. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Annals of neurology* 59, 512-519.

Fargin A., Raymond J. R., Lohse M. J., Kobilka B. K., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. *Nature* 335, 358-360.

Feldman H., Scheltens P., Scarpini E., Hermann N., Mesenbrink P., Mancione L., Tekin S., Lane R. and Ferris S. (2004). Behavioral symptoms in mild cognitive impairment. *Neurology* 62, 1199-1201.

Ferrari L., Turrini G., Crestan V., Bertani S., Cristofori P., Bifone A. and Gozzi A. (2012). A robust experimental protocol for pharmacological fMRI in rats and mice. *Journal of neuroscience methods* 204, 9-18.

Ferreira L. K., Diniz B. S., Forlenza O. V., Busatto G. F. and Zanetti M. V. (2011). Neurostructural predictors of Alzheimer's disease: a meta-analysis of VBM studies. *Neurobiology of aging* 32, 1733-1741.

Ferreira S. T. and Klein W. L. (2011). The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiology of learning and memory* 96, 529-543.

Fleisher A. S., Raman R., Siemers E. R., Becerra L., Clark C. M., Dean R. A., Farlow M. R., Galvin J. E., Peskind E. R., Quinn J. F., et al. (2008). Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 65, 1031-1038.

Fletcher A., Forster E. A., Bill D. J., Brown G., Cliffe I. A., Hartley J. E., Jones D. E., McLenachan A., Stanhope K. J., Critchley D. J., et al. (1996). Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT1A receptor antagonist. *Behavioural brain research* 73, 337-353.

Folstein M. F., Folstein S. E. and McHugh P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research* 12, 189-198.

Fone K. C., Marsden C. A., Bentley J. and Woolley M. L. (2002). Abstract from 5th IUPHAR Satellite Meeting on Serotonin, 77.

Fornal C. A., Metzler C. W., Gallegos R. A., Veasey S. C., McCreary A. C. and Jacobs B. L. (1996). WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine1A antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278, 752-762.

Forsberg A., Engler H., Almkvist O., Blomquist G., Hagman G., Wall A., Ringheim A., Langstrom B. and Nordberg A. (2008). PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging* 29, 1456-1465.

Forster E. A., Cliffe I. A., Bill D. J., Dover G. M., Jones D., Reilly Y. and Fletcher A. (1995). A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635. *European journal of pharmacology* 281, 81-88.

Forutan F., Estalji S., Beu M., Nikolaus S., Hamacher K., Coenen H. H., Vosberg H., Muller-Gartner H. W. and Larisch R. (2002). Distribution of 5HT<sub>2A</sub> receptors in the human brain: comparison of data in vivo and post mortem. *Nuklearmedizin Nuclear medicine* 41, 197-201.

Francis P. T. (2008). Glutamatergic approaches to the treatment of cognitive and behavioural symptoms of Alzheimer's disease. *Neuro-degenerative diseases* 5, 241-243.

Francis P. T., Pangalos M. N., Stephens P. H., Bartlett J. R., Bridges P. K., Malizia A. L., Neary D., Procter A. W., Thomas D. J. and Bowen D. M. (1993a). Antemortem measurements of neurotransmission: possible implications for pharmacotherapy of Alzheimer's disease and depression. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 56, 80-84.

Francis P. T., Sims N. R., Procter A. W. and Bowen D. M. (1993b). Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives. *Journal of neurochemistry* 60, 1589-1604.

Fratiglioni L., Wang H. X., Ericsson K., Maytan M. and Winblad B. (2000). Influence of social network on occurrence of dementia: a community-based longitudinal study. *Lancet* 355, 1315-1319.

Freo U., Pietrini P., Pizzolato G., Furey-Kurkjian M., Merico A., Ruggero S., Dam M. and Battistin L. (1995). Dose-dependent effects of buspirone on behavior and cerebral glucose metabolism in rats. *Brain research* 677, 213-220.

Gaddum J. H. and Picarelli Z. P. (1957). Two kinds of tryptamine receptor. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 12, 323-328.

Gerard C., el Mestikawy S., Lebrand C., Adrien J., Ruat M., Traiffort E., Hamon M. and Martres M. P. (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23, 164-173.

Gerard C., Martres M. P., Lefevre K., Miquel M. C., Verge D., Lanfumey L., Doucet E., Hamon M. and el Mestikawy S. (1997). Immuno-localization of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain research* 746, 207-219.

Gettys T. W., Fields T. A. and Raymond J. R. (1994). Selective activation of inhibitory G-protein alpha-subunits by partial agonists of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Biochemistry* 33, 4283-4290.

Gillette Guyonnet S., Abellan Van Kan G., Alix E., Andrieu S., Belmin J., Berrut G., Bonnefoy M., Brocker P., Constans T., Ferry M., et al. (2007). IANA (International Academy on Nutrition and Aging) Expert Group: weight loss and Alzheimer's disease. *The journal of nutrition, health & aging* 11, 38-48.

Glennon R. A. (2003). Higher-end serotonin receptors: 5-HT(5), 5-HT(6), and 5-HT(7). *Journal of medicinal chemistry* 46, 2795-2812.

Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.

Goedert M. (1999). Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 354, 1101-1118.

Goedert M., Klug A. and Crowther R. A. (2006). Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9, 195-207.

Gotz J., Ittner A. and Ittner L. M. (2012). Tau-targeted treatment strategies in Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology* 165, 1246-1259.

Gozlan H., El Mestikawy S., Pichat L., Glowinski J. and Hamon M. (1983). Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 305, 140-142.

Gozlan H., Thibault S., Laporte A. M., Lima L. and Hamon M. (1995). The selective 5-HT<sub>1A</sub> antagonist radioligand [3H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain membranes. *European journal of pharmacology* 288, 173-186.

Greig N. H., Lahiri D. K. and Jacobini E. (2005). Editorial: advances in Alzheimer therapy: something old, something new, something borrowed, something blue. *Current Alzheimer research* 2, 275-279.

Guériot-Milandre C., Semprez C. and Poncet M. (1997). Aspects cliniques et diagnostic. *Médecine thérapeutique* 3, 343-352.

Hall H., Lundkvist C., Halldin C., Farde L., Pike V. W., McCarron J. A., Fletcher A., Cliffe I. A., Barf T., Wikstrom H., et al. (1997). Autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635. *Brain research* 745, 96-108.

Hall M. D., el Mestikawy S., Emerit M. B., Pichat L., Hamon M. and Gozlan H. (1985). [3H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *Journal of neurochemistry* *44*, 1685-1696.

Hamon M., Doucet E., Lefevre K., Miquel M. C., Lanfumey L., Insausti R., Frechilla D., Del Rio J. and Verge D. (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* *21*, 68S-76S.

Hamon M., Gozlan H., el Mestikawy S., Emerit M. B., Bolanos F. and Schechter L. (1990). The central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Annals of the New York Academy of Sciences* *600*, 114-129; discussion 129-131.

Hampel H., Buerger K., Zinkowski R., Teipel S. J., Goernitz A., Andreasen N., Sjoegren M., DeBernardis J., Kerkman D., Ishiguro K., et al. (2004). Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Archives of general psychiatry* *61*, 95-102.

Harder J. A., Maclean C. J., Alder J. T., Francis P. T. and Ridley R. M. (1996). The 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, WAY 100635, ameliorates the cognitive impairment induced by fornix transection in the marmoset. *Psychopharmacology* *127*, 245-254.

Harder J. A. and Ridley R. M. (2000). The 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, WAY 100 635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Neuropharmacology* *39*, 547-552.

Hardy J. A. and Higgins G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* *256*, 184-185.

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. *Nature genetics* *41*, 1088-1093.

Helmer C., Pasquier F. and Dartigues J. F. (2006a). [Epidemiology of Alzheimer disease and related disorders]. *Medecine sciences : M/S* *22*, 288-296.

Helmer C., Peres K., Letenneur L., Gutierrez-Robledo L. M., Ramarosan H., Barberger-Gateau P., Fabrigoule C., Orgogozo J. M. and Dartigues J. F. (2006b). Dementia in subjects aged 75 years or over within the PAQUID cohort: prevalence and burden by severity. *Dementia and geriatric cognitive disorders* *22*, 87-94.

Hensler J. G. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* *30*, 203-214.

Herholz K. and Ebmeier K. (2011). Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet neurology* 10, 667-670.

Hirst W. D., Abrahamsen B., Blaney F. E., Calver A. R., Aloj L., Price G. W. and Medhurst A. D. (2003). Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Molecular pharmacology* 64, 1295-1308.

Hirst W. D., Minton J. A., Bromidge S. M., Moss S. F., Latter A. J., Riley G., Routledge C., Middlemiss D. N. and Price G. W. (2000). Characterization of [(125)I]-SB-258585 binding to human recombinant and native 5-HT(6) receptors in rat, pig and human brain tissue. *British journal of pharmacology* 130, 1597-1605.

Hock C., Konietzko U., Streffer J. R., Tracy J., Signorell A., Muller-Tillmanns B., Lemke U., Henke K., Moritz E., Garcia E., et al. (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38, 547-554.

Holbrook J. D., Gill C. H., Zebda N., Spencer J. P., Leyland R., Rance K. H., Trinh H., Balmer G., Kelly F. M., Yusaf S. P., et al. (2009). Characterisation of 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> and 5-HT<sub>3E</sub> receptor subunits: evolution, distribution and function. *Journal of neurochemistry* 108, 384-396.

Holenz J., Merce R., Diaz J. L., Guitart X., Codony X., Dordal A., Romero G., Torrens A., Mas J., Andaluz B., et al. (2005). Medicinal chemistry driven approaches toward novel and selective serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor ligands. *Journal of medicinal chemistry* 48, 1781-1795.

Holland D., Brewer J. B., Hagler D. J., Fennema-Notestine C. and Dale A. M. (2009). Subregional neuroanatomical change as a biomarker for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20954-20959.

Hornung J. P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of chemical neuroanatomy* 26, 331-343.

Hoyer D., Clarke D. E., Fozard J. R., Hartig P. R., Martin G. R., Mylecharane E. J., Saxena P. R. and Humphrey P. P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews* 46, 157-203.

Hoyer D., Hannon J. P. and Martin G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71, 533-554.

Hussain I., Hawkins J., Harrison D., Hille C., Wayne G., Cutler L., Buck T., Walter D., Demont E., Howes C., et al. (2007). Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo. *Journal of neurochemistry* 100, 802-809.

Iderberg H., Francardo V. and Pioli E. Y. (2012). Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: an update on the current options. *Neuroscience* 211, 13-27.

Isayama S., Sugimoto Y., Nishiga M. and Kamei C. (2001). Effects of histidine on working memory deficits induced by the 5-HT<sub>1A</sub>-receptor agonist 8-OH-DPAT. *Japanese journal of pharmacology* 86, 451-453.

Ishihara A., Hashimoto Y., Tanaka C., Dubouzet J. G., Nakao T., Matsuda F., Nishioka T., Miyagawa H. and Wakasa K. (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54, 481-495.

Ishihara T., Hong M., Zhang B., Nakagawa Y., Lee M. K., Trojanowski J. Q. and Lee V. M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-762.

Ishiwata K., Kawamura K., Yanai K. and Hendrikse N. H. (2007). In vivo evaluation of P-glycoprotein modulation of 8 PET radioligands used clinically. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 48, 81-87.

Ivanoiu A., Adam S., Van der Linden M., Salmon E., Juillerat A. C., Mulligan R. and Seron X. (2005). Memory evaluation with a new cued recall test in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of neurology* 252, 47-55.

Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N. and Ihara Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45-53.

Jagust W. J., Landau S. M., Shaw L. M., Trojanowski J. Q., Koeppe R. A., Reiman E. M., Foster N. L., Petersen R. C., Weiner M. W., Price J. C., et al. (2009). Relationships between biomarkers in aging and dementia. *Neurology* 73, 1193-1199.

Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P. M., Jiang Y., Schmidt S. D., Chishti M. A., Horne P., Heslin D., French J., et al. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979-982.

Jasper H. H. and Ajmone-Marsan C. (1954). A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. Ottawa: The National Research Council of Canada Editors.

Jayadev S., Steinbart E. J., Chi Y. Y., Kukull W. A., Schellenberg G. D. and Bird T. D. (2008). Conjugal Alzheimer disease: risk in children when both parents have Alzheimer disease. *Archives of neurology* 65, 373-378.

Johnström P. and Davenport A. P. (2005). Imaging and Characterization of Radioligands for Positron Emission Tomography Using Quantitative Phosphor imaging Autoradiography. In *Receptor Binding Techniques*, A. P. Davenport, ed. (Humana Press Inc.), pp. 203-216.

Jovanovic H., Perski A., Berglund H. and Savic I. (2011). Chronic stress is linked to 5-HT(1A) receptor changes and functional disintegration of the limbic networks. *NeuroImage* 55, 1178-1188.

Kalafat M., Hugonot-Diener L. and Poitrenaud J. (2003). Standardisation et étalonnage français du « Mini Mental State » (MMS) version GRECO. *Rev Neuropsychol* 13, 209-236.

Kazee A. M., Eskin T. A., Lapham L. W., Gabriel K. R., McDaniel K. D. and Hamill R. W. (1993). Clinicopathologic correlates in Alzheimer disease: assessment of clinical and pathologic diagnostic criteria. *Alzheimer disease and associated disorders* 7, 152-164.

Kempler D. (1988). Verbal and pantomime abilities in Alzheimer's disease. *Aphasiology* 2, 147-159.

Kemppainen N. M., Aalto S., Wilson I. A., Nagren K., Helin S., Bruck A., Oikonen V., Kailajarvi M., Scheinin M., Viitanen M., et al. (2006). Voxel-based analysis of PET amyloid ligand [<sup>11</sup>C]PIB uptake in Alzheimer disease. *Neurology* 67, 1575-1580.

Kenakin T. P. (2012). Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *British journal of pharmacology* 165, 1659-1669.

Kendall I., Slotten H. A., Codony X., Burgueno J., Pauwels P. J., Vela J. M. and Fone K. C. (2011). E-6801, a 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist, improves recognition memory by combined modulation of cholinergic and glutamatergic neurotransmission in the rat. *Psychopharmacology* 213, 413-430.

Kepe V., Barrio J. R., Huang S. C., Ercoli L., Siddarth P., Shoghi-Jadid K., Cole G. M., Satyamurthy N., Cummings J. L., Small G. W., et al. (2006). Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 702-707.

Khawaja X., Evans N., Reilly Y., Ennis C. and Minchin M. C. (1995). Characterisation of the binding of [<sup>3</sup>H]WAY-100635, a novel 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor antagonist, to rat brain. *Journal of neurochemistry* 64, 2716-2726.

Kia H. K., Miquel M. C., Brisorgueil M. J., Daval G., Riad M., El Mestikawy S., Hamon M. and Verge D. (1996). Immunocytochemical localization of serotonin<sub>1A</sub> receptors in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 365, 289-305.

Kinsey A. M., Wainwright A., Heavens R., Sirinathsinghji D. J. and Oliver K. R. (2001). Distribution of 5-HT(5A), 5-HT(5B), 5-HT(6) and 5-HT(7) receptor mRNAs in the rat brain. *Brain research Molecular brain research* 88, 194-198.

Kittelberger K. A., Piazza F., Tesco G. and Reijmers L. G. (2012). Natural amyloid-beta oligomers acutely impair the formation of a contextual fear memory in mice. *PLoS one* 7, e29940.



Klunk W. E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist G., Holt D. P., Bergstrom M., Savitcheva I., Huang G. F., Estrada S., et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of neurology* 55, 306-319.

Kobilka B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annual review of neuroscience* 15, 87-114.

Kobilka B. K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T. S., Francke U., Lefkowitz R. J. and Caron M. G. (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329, 75-79.

Koeppel R. A., Gilman S., Joshi A., Liu S., Little R., Junck L., Heumann M., Frey K. A. and Albin R. L. (2005). 11C-DTBZ and 18F-FDG PET measures in differentiating dementias. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 46, 936-944.

Kohen R., Fashingbauer L. A., Heidmann D. E., Guthrie C. R. and Hamblin M. W. (2001). Cloning of the mouse 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain research Molecular brain research* 90, 110-117.

Kohen R., Metcalf M. A., Khan N., Druck T., Huebner K., Lachowicz J. E., Meltzer H. Y., Sibley D. R., Roth B. L. and Hamblin M. W. (1996). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor. *Journal of neurochemistry* 66, 47-56.

Koopman K., Le Bastard N., Martin J. J., Nagels G., De Deyn P. P. and Engelborghs S. (2009). Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease (AD) from non-AD dementias using CSF P-tau(181P). *Neurochemistry international* 55, 214-218.

Korf E. S., Wahlund L. O., Visser P. J. and Scheltens P. (2004). Medial temporal lobe atrophy on MRI predicts dementia in patients with mild cognitive impairment. *Neurology* 63, 94-100.

Kung M. P., Frederick D., Mu M., Zhuang Z. P. and Kung H. F. (1995). 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl- piperazine ([<sup>125</sup>I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-1A sites in rat brain: in vitro binding and autoradiographic studies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 272, 429-437.

Lacivita E., Di Pilato P., De Giorgio P., Colabufo N. A., Berardi F., Perrone R. and Leopoldo M. (2012). The therapeutic potential of 5-HT<sub>1A</sub> receptors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 22, 887-902.

Lai M. K., Tsang S. W., Alder J. T., Keene J., Hope T., Esiri M. M., Francis P. T. and Chen C. P. (2005). Loss of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 179, 673-677.

Lai M. K., Tsang S. W., Esiri M. M., Francis P. T., Wong P. T. and Chen C. P. (2011). Differential involvement of hippocampal serotonin<sub>1A</sub> receptors and re-uptake sites in non-cognitive behaviors of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 213, 431-439.

Lai M. K., Tsang S. W., Francis P. T., Esiri M. M., Keene J., Hope T. and Chen C. P. (2003). Reduced serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease. *Brain research* 974, 82-87.

Lai M. K., Tsang S. W., Francis P. T., Keene J., Hope T., Esiri M. M., Spence I. and Chen C. P. (2002). Postmortem serotonergic correlates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13, 1175-1178.

Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ <sub>1-42</sub> are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6448-6453.

Lanctot K. L., Hussey D. F., Herrmann N., Black S. E., Rusjan P. M., Wilson A. A., Houle S., Kozloff N., Verhoeff N. P. and Kapur S. (2007). A positron emission tomography study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 15, 888-898.

Landau S. M., Breault C., Joshi A. D., Pontecorvo M., Mathis C. A., Jagust W. J. and Mintun M. A. (2013). Amyloid-beta imaging with Pittsburgh compound B and florbetapir: comparing radiotracers and quantification methods. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54, 70-77.

Lane H. Y., Lin C. C., Huang C. H., Chang Y. C., Hsu S. K. and Chang W. H. (2004). Risperidone response and 5-HT<sub>6</sub> receptor gene variance: genetic association analysis with adjustment for nongenetic confounders. *Schizophrenia research* 67, 63-70.

Lanfume L. and Hamon M. (2000). Central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nuclear medicine and biology* 27, 429-435.

Lanfume L. and Hamon M. (2004). 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 3, 1-10.

Lasagna-Reeves C. A., Castillo-Carranza D. L., Sengupta U., Clos A. L., Jackson G. R. and Kaye R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular neurodegeneration* 6, 39.

Lawlor B. A. (2004). Behavioral and psychological symptoms in dementia: the role of atypical antipsychotics. *The Journal of clinical psychiatry* 65 Suppl 11, 5-10.

Le Bars D., Lemaire C., Ginovart N., Plenevaux A., Aerts J., Brihaye C., Hassoun W., Leviel V., Mekhsian P., Weissmann D., et al. (1998). High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[<sup>18</sup>F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nuclear medicine and biology* 25, 343-350.

Lefkowitz R. J. and Shenoy S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.

Lehmann S., Schraen S., Quadrio I., Paquet C., Bombois S., Delaby C., Dorey A., Dumurgier J., Hirtz C., Krolak-Salmon P., et al. (2013). Impact of harmonization of collection tubes on Alzheimer's disease diagnosis. *Alzheimer's & Dementia*, 1-7.

Lemoine L., Becker G., Vacher B., Billard T., Lancelot S., Newman-Tancredi A. and Zimmer L. (2012). Radiosynthesis and preclinical evaluation of <sup>18</sup>F-F13714 as a fluorinated 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist radioligand for PET neuroimaging. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53, 969-976.

Lemoine L., Verdurand M., Vacher B., Blanc E., Le Bars D., Newman-Tancredi A. and Zimmer L. (2010). [<sup>18</sup>F]F15599, a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 37, 594-605.

Levy-Lahad E., Wijsman E. M., Nemens E., Anderson L., Goddard K. A., Weber J. L., Bird T. D. and Schellenberg G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.

Lewis J., Dickson D. W., Lin W. L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S. H., Sahara N., Skipper L., Yager D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-1491.

Li Y., Rinne J. O., Mosconi L., Pirraglia E., Rusinek H., DeSanti S., Kemppainen N., Nagren K., Kim B. C., Tsui W., et al. (2008). Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35, 2169-2181.

Lindsay J., Laurin D., Verreault R., Hebert R., Helliwell B., Hill G. B. and 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, 445-453.

Liu C. C., Kanekiyo T., Xu H. and Bu G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature reviews Neurology* 9, 106-118.

Liu F., Majo V. J., Prabhakaran J., Milak M. S., John Mann J., Parsey R. V. and Kumar J. S. (2011). Synthesis and in vivo evaluation of [O-methyl-<sup>11</sup>C] N-[3,5-dichloro-2-(methoxy)phenyl]-4-(methoxy)-3-(1-piperazinyl)benzenesulfonamide as an imaging probe for 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 19, 5255-5259.

Llado-Pelfort L., Assie M. B., Newman-Tancredi A., Artigas F. and Celada P. (2010). Preferential in vivo action of F15599, a novel 5-HT(1A) receptor agonist, at postsynaptic 5-HT(1A) receptors. *British journal of pharmacology* 160, 1929-1940.

Lopez-Rodriguez M. L., Benhamu B., de la Fuente T., Sanz A., Pardo L. and Campillo M. (2005). A three-dimensional pharmacophore model for 5-hydroxytryptamine<sub>6</sub> (5-HT<sub>6</sub>) receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 48, 4216-4219.

Lorke D. E., Lu G., Cho E. and Yew D. T. (2006). Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC neuroscience* 7, 36.

Lovenberg T. W., Baron B. M., de Lecea L., Miller J. D., Prosser R. A., Rea M. A., Foye P. E., Racke M., Slone A. L., Siegel B. W., et al. (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11, 449-458.

Lyness S. A., Zarow C. and Chui H. C. (2003). Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiology of aging* 24, 1-23.

Madeo J. and Frieri M. (2013). Alzheimer's disease and immunotherapy. *Aging and disease* 4, 210-220.

Mann D. M. and Esiri M. M. (1989). The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *Journal of the neurological sciences* 89, 169-179.

Mannoury la Cour C., El Mestikawy S., Hanoun N., Hamon M. and Lanfumey L. (2006). Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Molecular pharmacology* 70, 1013-1021.

Marazziti D., Baroni S., Pirone A., Giannaccini G., Betti L., Schmid L., Vatteroni E., Palego L., Borsini F., Bordi F., et al. (2012). Distribution of serotonin receptor of type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in human brain post-mortem. A pharmacology, autoradiography and immunohistochemistry study. *Neurochemical research* 37, 920-927.

Marazziti D., Baroni S., Pirone A., Giannaccini G., Betti L., Testa G., Schmid L., Palego L., Borsini F., Bordi F., et al. (2013). Serotonin receptor of type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: an immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochemistry international* 62, 182-188.

Marcos B., Gil-Bea F. J., Hirst W. D., Garcia-Alloza M. and Ramirez M. J. (2006). Lack of localization of 5-HT<sub>6</sub> receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT<sub>6</sub> receptor-mediated acetylcholine release. *The European journal of neuroscience* 24, 1299-1306.

Martarello L., Ahmed M., Chuang A. T., Cunningham V. J., Jakobsen S., Johnson C. N., Matthews J. C., Medhurst A., Moss S. F., Rabiner E. A., et al. (2005). Radiolabelling and in vivo evaluation of [<sup>11</sup>C]GSK210583 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand in the porcine brain. *J Label Comp Radiopharm* 48, 341.

Martin C. and Sibson N. R. (2008). Pharmacological MRI in animal models: a useful tool for 5-HT research? *Neuropharmacology* 55, 1038-1047.

Martin-Cora F. J. and Pazos A. (2004). Autoradiographic distribution of 5-HT<sub>7</sub> receptors in the human brain using [3H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *British journal of pharmacology* 141, 92-104.

Martinez D., Broft A. and Laruelle M. (2000). Pindolol augmentation of antidepressant treatment: recent contributions from brain imaging studies. *Biological psychiatry* 48, 844-853.

Masellis M., Basile V. S., Meltzer H. Y., Lieberman J. A., Sevy S., Goldman D. A., Hamblin M. W., Macciardi F. M. and Kennedy J. L. (2001). Lack of association between the T→C 267 serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor gene (HTR6) polymorphism and prediction of response to clozapine in schizophrenia. *Schizophrenia research* 47, 49-58.

Mathis C. A., Mason N. S., Lopresti B. J. and Klunk W. E. (2012). Development of positron emission tomography beta-amyloid plaque imaging agents. *Seminars in nuclear medicine* 42, 423-432.

Matthes S., Mosienko V., Bashammakh S., Alenina N. and Bader M. (2010). Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders. *Pharmacology* 85, 95-109.

Mattson M. P. and Furukawa K. (1997). Alzheimer's disease. Short precursor shortens memory. *Nature* 387, 457-458.

Maurel J. L., Autin J. M., Funes P., Newman-Tancredi A., Colpaert F. and Vacher B. (2007). High-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> agonists for antidepressant treatment: a renewed opportunity. *Journal of medicinal chemistry* 50, 5024-5033.

Mayeux R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual review of neuroscience* 26, 81-104.

Mayeux R. and Schupf N. (2011). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: plasma Aβ<sub>40</sub> and Aβ<sub>42</sub>, and genetic variants. *Neurobiology of aging* 32 *Suppl* 1, S10-19.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D. and Stadlan E. M. (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, 939-944.

McKhann G. M., Knopman D. S., Chertkow H., Hyman B. T., Jack C. R., Jr., Kawas C. H., Klunk W. E., Koroshetz W. J., Manly J. J., Mayeux R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7, 263-269.

McKie S., Del-Ben C., Elliott R., Williams S., del Vai N., Anderson I. and Deakin J. F. (2005). Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacMRI. *Psychopharmacology* 180, 680-686.

Middlemiss D. N., Palmer A. M., Edel N. and Bowen D. M. (1986). Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in normal and Alzheimer brain. *Journal of neurochemistry* *46*, 993-996.

Millan M. J., Marin P., Bockaert J. and Mannoury la Cour C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in pharmacological sciences* *29*, 454-464.

Minoshima S., Foster N. L., Sima A. A., Frey K. A., Albin R. L. and Kuhl D. E. (2001). Alzheimer's disease versus dementia with Lewy bodies: cerebral metabolic distinction with autopsy confirmation. *Annals of neurology* *50*, 358-365.

Mizukami K., Ishikawa M., Akatsu H., Abrahamson E. E., Ikonovic M. D. and Asada T. (2011). An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the hippocampus of subjects with Alzheimer's disease. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* *31*, 503-509.

Mochizuki H., Amano T., Seki T., Matsubayashi H., Mitsuhashi C., Morita K., Kitayama S., Dohi T., Mishima H. K. and Sakai N. (2005). Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT). *Neurochemistry international* *46*, 93-105.

Monsma F. J., Jr., Shen Y., Ward R. P., Hamblin M. W. and Sibley D. R. (1993). Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Molecular pharmacology* *43*, 320-327.

Morgan D., Diamond D. M., Gottschall P. E., Ugen K. E., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* *408*, 982-985.

Morris J. C. (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* *43*, 2412-2414.

Morris J. C., Roe C. M., Grant E. A., Head D., Storandt M., Goate A. M., Fagan A. M., Holtzman D. M. and Mintun M. A. (2009). Pittsburgh compound B imaging and prediction of progression from cognitive normality to symptomatic Alzheimer disease. *Archives of neurology* *66*, 1469-1475.

Morris R. G., Anderson E., Lynch G. S. and Baudry M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* *319*, 774-776.

Mosconi L., Mistur R., Switalski R., Brys M., Glodzik L., Rich K., Pirraglia E., Tsui W., De Santi S. and de Leon M. J. (2009). Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease. *Neurology* *72*, 513-520.

Mosconi L., Perani D., Sorbi S., Herholz K., Nacmias B., Holthoff V., Salmon E., Baron J. C., De Cristofaro M. T., Padovani A., et al. (2004). MCI conversion to dementia and the APOE genotype: a prediction study with FDG-PET. *Neurology* 63, 2332-2340.

Mosconi L., Tsui W. H., De Santi S., Li J., Rusinek H., Convit A., Li Y., Boppana M. and de Leon M. J. (2005). Reduced hippocampal metabolism in MCI and AD: automated FDG-PET image analysis. *Neurology* 64, 1860-1867.

Mudher A. and Lovestone S. (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in neurosciences* 25, 22-26.

Mueggler T., Razoux F., Russig H., Buehler A., Franklin T. B., Baltes C., Mansuy I. M. and Rudin M. (2011). Mapping of CBV changes in 5-HT(1A) terminal fields by functional MRI in the mouse brain. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 21, 344-353.

Mufson E. J., Counts S. E., Perez S. E. and Ginsberg S. D. (2008). Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert review of neurotherapeutics* 8, 1703-1718.

Myhrer T. (2000). Effects of selective perirhinal and postrhinal lesions on acquisition and retention of a visual discrimination task in rats. *Neurobiology of learning and memory* 73, 68-78.

Nagy Z., Esiri M. M., Jobst K. A., Morris J. H., King E. M., McDonald B., Litchfield S. and Barnettson L. (1996). Clustering of pathological features in Alzheimer's disease: clinical and neuroanatomical aspects. *Dementia* 7, 121-127.

Nakatani Y., Sato-Suzuki I., Tsujino N., Nakasato A., Seki Y., Fumoto M. and Arita H. (2008). Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *The European journal of neuroscience* 27, 2466-2472.

Nestor P. J., Fryer T. D., Smielewski P. and Hodges J. R. (2003). Limbic hypometabolism in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Annals of neurology* 54, 343-351.

Newman-Tancredi A., Martel J. C., Assie M. B., Buritova J., Laouressergues E., Cosi C., Heusler P., Bruins Slot L., Colpaert F. C., Vacher B., et al. (2009). Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT1A receptor agonist. *British journal of pharmacology* 156, 338-353.

Nordberg A., Rinne J. O., Kadir A. and Langstrom B. (2010). The use of PET in Alzheimer disease. *Nature reviews Neurology* 6, 78-87.

Oleskevich S., Descarries L., Watkins K. C., Seguela P. and Daszuta A. (1991). Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* 42, 777-791.

Olsen M. A., Nawoschik S. P., Schurman B. R., Schmitt H. L., Burno M., Smith D. L. and Schechter L. E. (1999). Identification of a human 5-HT<sub>6</sub> receptor variant produced by alternative splicing. *Brain research Molecular brain research* 64, 255-263.

Orgogozo J. M., Dartigues J. F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S. and Breteler M. B. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue neurologique* 153, 185-192.

Orgogozo J. M., Gilman S., Dartigues J. F., Laurent B., Puel M., Kirby L. C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., et al. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta<sub>42</sub> immunization. *Neurology* 61, 46-54.

Otto M., Wiltfang J., Tumani H., Zerr I., Lantsch M., Kornhuber J., Weber T., Kretschmar H. A. and Poser S. (1997). Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience letters* 225, 210-212.

Parker C. A., Gunn R. N., Rabiner E. A., Slifstein M., Comley R., Salinas C., Johnson C. N., Jakobsen S., Houle S., Laruelle M., et al. (2012). Radiosynthesis and characterization of <sup>11</sup>C-GSK215083 as a PET radioligand for the 5-HT<sub>6</sub> receptor. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53, 295-303.

Patwardhan M. B., McCrory D. C., Matchar D. B., Samsa G. P. and Rutschmann O. T. (2004). Alzheimer disease: operating characteristics of PET--a meta-analysis. *Radiology* 231, 73-80.

Paxinos G. and Watson C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. second ed Academic Press, New York.

Pazos A. and Palacios J. M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain research* 346, 205-230.

Pazos A., Probst A. and Palacios J. M. (1987). Serotonin receptors in the human brain--IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* 21, 123-139.

Pedigo N. W., Yamamura H. I. and Nelson D. L. (1981). Discrimination of multiple [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *Journal of neurochemistry* 36, 220-226.

Peroutka S. J. and Snyder S. H. (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *Molecular pharmacology* 16, 687-699.

Petersen R. C., Doody R., Kurz A., Mohs R. C., Morris J. C., Rabins P. V., Ritchie K., Rossor M., Thal L. and Winblad B. (2001). Current concepts in mild cognitive impairment. *Archives of neurology* 58, 1985-1992.



Petersen R. C., Smith G. E., Waring S. C., Ivnik R. J., Tangalos E. G. and Kokmen E. (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology* 56, 303-308.

Petersen R. C., Thomas R. G., Grundman M., Bennett D., Doody R., Ferris S., Galasko D., Jin S., Kaye J., Levey A., et al. (2005). Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine* 352, 2379-2388.

Picazo O., Lopez-Rubalcava C. and Fernandez-Guasti A. (1995). Anxiolytic effect of the 5-HT<sub>1A</sub> compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. *Brain research bulletin* 37, 169-175.

Pineyro G. and Blier P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacological reviews* 51, 533-591.

Plenevaux A., Weissmann D., Aerts J., Lemaire C., Brihaye C., Degueldre C., Le Bars D., Comar D., Pujol J. and Luxen A. (2000). Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2' -[N-2"-pyridinyl]-p-[(18)F]fluorobenzamido]ethyl]piperazine (p-[(18)F]MPPF), a new serotonin 5-HT<sub>1A</sub> antagonist for positron emission tomography: An In vivo study in rats. *Journal of neurochemistry* 75, 803-811.

Polter A. M. and Li X. (2010). 5-HT<sub>1A</sub> receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cellular signalling* 22, 1406-1412.

Pompeiano M., Palacios J. M. and Mengod G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 440-453.

Pottier C., Hannequin D., Coutant S., Rovelet-Lecrux A., Wallon D., Rousseau S., Legallic S., Paquet C., Bombois S., Pariente J., et al. (2012). High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Molecular psychiatry* 17, 875-879.

Putcha D., Brickhouse M., O'Keefe K., Sullivan C., Rentz D., Marshall G., Dickerson B. and Sperling R. (2011). Hippocampal hyperactivation associated with cortical thinning in Alzheimer's disease signature regions in non-demented elderly adults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 17680-17688.

Ramaroson H., Helmer C., Barberger-Gateau P., Letenneur L. and Dartigues J. F. (2003). [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Revue neurologique* 159, 405-411.

Ramirez M. J. (2013). 5-HT<sub>6</sub> receptors and Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy* 5, 15.

Reiman E. M. (2011). Fluorodeoxyglucose positron emission tomography: emerging roles in the evaluation of putative Alzheimer's disease-modifying treatments. *Neurobiology of aging* 32 Suppl 1, S44-47.

Reiter E., Ahn S., Shukla A. K. and Lefkowitz R. J. (2012). Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, 179-197.

Reitz C., Tang M. X., Manly J., Mayeux R. and Luchsinger J. A. (2007). Hypertension and the risk of mild cognitive impairment. *Archives of neurology* 64, 1734-1740.

Resnick S. M., Sojkova J., Zhou Y., An Y., Ye W., Holt D. P., Dannals R. F., Mathis C. A., Klunk W. E., Ferrucci L., et al. (2010). Longitudinal cognitive decline is associated with fibrillar amyloid-beta measured by [<sup>11</sup>C]PiB. *Neurology* 74, 807-815.

Riad M., Garcia S., Watkins K. C., Jodoin N., Doucet E., Langlois X., el Mestikawy S., Hamon M. and Descarries L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *The Journal of comparative neurology* 417, 181-194.

Riad M., Watkins K. C., Doucet E., Hamon M. and Descarries L. (2001). Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 8378-8386.

Richardson-Jones J. W., Craige C. P., Guiard B. P., Stephen A., Metzger K. L., Kung H. F., Gardier A. M., Dranovsky A., David D. J., Beck S. G., et al. (2010). 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65, 40-52.

Roberts J. C., Reavill C., East S. Z., Harrison P. J., Patel S., Routledge C. and Leslie R. A. (2002). The distribution of 5-HT(6) receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT(6) receptor antagonist [(125)I]SB-258585. *Brain research* 934, 49-57.

Rowe C. C., Ackerman U., Browne W., Mulligan R., Pike K. L., O'Keefe G., Tochon-Danguy H., Chan G., Berlangieri S. U., Jones G., et al. (2008). Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet neurology* 7, 129-135.

Ruat M., Traiffort E., Arrang J. M., Tardivel-Lacombe J., Diaz J., Leurs R. and Schwartz J. C. (1993a). A novel rat serotonin (5-HT<sub>6</sub>) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochemical and biophysical research communications* 193, 268-276.

Ruat M., Traiffort E., Leurs R., Tardivel-Lacombe J., Diaz J., Arrang J. M. and Schwartz J. C. (1993b). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8547-8551.

Saenz del Burgo L., Cortes R., Mengod G., Zarate J., Echevarria E. and Salles J. (2008). Distribution and neurochemical characterization of neurons expressing GIRK channels in the rat brain. *The Journal of comparative neurology* 510, 581-606.

Samgard K., Zetterberg H., Blennow K., Hansson O., Minthon L. and Londos E. (2010). Cerebrospinal fluid total tau as a marker of Alzheimer's disease intensity. *International journal of geriatric psychiatry* 25, 403-410.

Samuraki M., Matsunari I., Chen W. P., Yajima K., Yanase D., Fujikawa A., Takeda N., Nishimura S., Matsuda H. and Yamada M. (2007). Partial volume effect-corrected FDG PET and grey matter volume loss in patients with mild Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 34, 1658-1669.

Sato S., Mizukami K. and Asada T. (2007). A preliminary open-label study of 5-HT<sub>1A</sub> partial agonist tandospirone for behavioural and psychological symptoms associated with dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 10, 281-283.

Scanley B. E., Kennan R. P. and Gore J. C. (2001). Changes in rat cerebral blood volume due to modulation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor measured with susceptibility enhanced contrast MRI. *Brain research* 913, 149-155.

Schechter L. E., Dawson L. A. and Harder J. A. (2002). The potential utility of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in the treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design* 8, 139-145.

Schechter L. E., Smith D. L., Rosenzweig-Lipson S., Sukoff S. J., Dawson L. A., Marquis K., Jones D., Piesla M., Andree T., Nawoschik S., et al. (2005). Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314, 1274-1289.

Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.

Schonheit B., Zarski R. and Ohm T. G. (2004). Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiology of aging* 25, 697-711.

Schwarz A. J., Gozzi A., Reese T. and Bifone A. (2007). In vivo mapping of functional connectivity in neurotransmitter systems using pharmacological MRI. *NeuroImage* 34, 1627-1636.

Sepehry A. A., Lee P. E., Hsiung G. Y. and Jacova C. (2012). Stay the course--is it justified? *Lancet* 379, 220.

Serpell L. C., Blake C. C. and Fraser P. E. (2000). Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment. *Biochemistry* 39, 13269-13275.

Setola V. and Roth B. L. (2003). Why mice are neither miniature humans nor small rats: a cautionary tale involving 5-hydroxytryptamine-6 serotonin receptor species variants. *Molecular pharmacology* 64, 1277-1278.

Shaffer J. L., Petrella J. R., Sheldon F. C., Choudhury K. R., Calhoun V. D., Coleman R. E. and Doraiswamy P. M. (2013). Predicting cognitive decline in subjects at risk for Alzheimer disease by using combined cerebrospinal fluid, MR imaging, and PET biomarkers. *Radiology* 266, 583-591.

Sherrington R., Rogaev E. I., Liang Y., Rogaeva E. A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

Shireman B. T., Bonaventure P. and Carruthers N. I. (2008). Recent Advances on the 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 43, 25-42.

Shoghi-Jadid K., Small G. W., Agdeppa E. D., Kepe V., Ercoli L. M., Siddarth P., Read S., Satyamurthy N., Petric A., Huang S. C., et al. (2002). Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 10, 24-35.

Silber B. Y. and Schmitt J. A. (2010). Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 34, 387-407.

Simic G., Kostovic I., Winblad B. and Bogdanovic N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *The Journal of comparative neurology* 379, 482-494.

Singh V., Chertkow H., Lerch J. P., Evans A. C., Dorr A. E. and Kabani N. J. (2006). Spatial patterns of cortical thinning in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 129, 2885-2893.

Sleight A. J., Boess F. G., Bos M., Levet-Trafit B., Riemer C. and Bourson A. (1998). Characterization of Ro 04-6790 and Ro 63-0563: potent and selective antagonists at human and rat 5-HT<sub>6</sub> receptors. *British journal of pharmacology* 124, 556-562.

Small G. W., Kepe V., Ercoli L. M., Siddarth P., Bookheimer S. Y., Miller K. J., Lavretsky H., Burggren A. C., Cole G. M., Vinters H. V., et al. (2006). PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *The New England journal of medicine* 355, 2652-2663.

Snider R. S. and Niemer W. T. (1961). A stereotaxic atlas of the cat brain. Chicago: University of Chicago Press.

Sotelo C., Cholley B., El Mestikawy S., Gozlan H. and Hamon M. (1990). Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *The European journal of neuroscience* 2, 1144-1154.

Sparks D. L. (1989). Aging and Alzheimer's disease. Altered cortical serotonergic binding. *Archives of neurology* 46, 138-140.

Sperling R. A., Johnson K. A., Doraiswamy P. M., Reiman E. M., Fleisher A. S., Sabbagh M. N., Sadowsky C. H., Carpenter A., Davis M. D., Lu M., et al. (2013). Amyloid deposition detected with florbetapir F 18 ((18)F-AV-45) is related to lower episodic memory performance in clinically normal older individuals. *Neurobiology of aging* 34, 822-831.

Sprouse J., Reynolds L., Li X., Braselton J. and Schmidt A. (2004). 8-OH-DPAT as a 5-HT7 agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology* 46, 52-62.

Sprouse J. S. and Aghajanian G. K. (1987). Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* 1, 3-9.

Sprouse J. S. and Aghajanian G. K. (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT1A and 5-HT1B agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27, 707-715.

Staubli U., Rogers G. and Lynch G. (1994). Facilitation of glutamate receptors enhances memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 777-781.

Steiner H. and Haass C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nature reviews Molecular cell biology* 1, 217-224.

Stern Y., Alexander G. E., Prohovnik I. and Mayeux R. (1992). Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 32, 371-375.

Stoothoff W. H. and Johnson G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 280-297.

Sun X. T., Jin L. and Ling P. X. (2012). Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug discoveries & therapeutics* 6, 285-290.

Szekely C. A., Thorne J. E., Zandi P. P., Ek M., Messias E., Breitner J. C. and Goodman S. N. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. *Neuroepidemiology* 23, 159-169.

Takahashi R. H., Almeida C. G., Kearney P. F., Yu F., Lin M. T., Milner T. A. and Gouras G. K. (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 3592-3599.

Tang S., Verdurand M., Joseph B., Lemoine L., Daoust A., Billard T., Fournet G., Le Bars D. and Zimmer L. (2007). Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [18F]12ST05 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand. *Nuclear medicine and biology* 34, 995-1002.

Tapiola T., Alafuzoff I., Herukka S. K., Parkkinen L., Hartikainen P., Soininen H. and Pirttila T. (2009). Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Archives of neurology* 66, 382-389.

Teipel S. J., Grothe M., Lista S., Toschi N., Garaci F. G. and Hampel H. (2013). Relevance of magnetic resonance imaging for early detection and diagnosis of Alzheimer disease. *The Medical clinics of North America* 97, 399-424.

Thal L. J., Ferris S. H., Kirby L., Block G. A., Lines C. R., Yuen E., Assaid C., Nessly M. L., Norman B. A., Baranak C. C., et al. (2005). A randomized, double-blind, study of rofecoxib in patients with mild cognitive impairment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30, 1204-1215.

Thathiah A. and De Strooper B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience* 12, 73-87.

Thome J., Retz W., Baader M., Pesold B., Hu M., Cowen M., Durany N., Adler G., Henn F. A. and Rosler M. (2001). Association analysis of HTR<sub>6</sub> and HTR<sub>2A</sub> polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 108, 1175-1180.

Truchot L., Costes N., Zimmer L., Laurent B., Le Bars D., Thomas-Anterion C., Mercier B., Hermier M., Vighetto A. and Krolak-Salmon P. (2008). A distinct [18F]MPPF PET profile in amnesic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease. *NeuroImage* 40, 1251-1256.

Truchot L., Costes S. N., Zimmer L., Laurent B., Le Bars D., Thomas-Anterion C., Croisile B., Mercier B., Hermier M., Vighetto A., et al. (2007). Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment. *Neurology* 69, 1012-1017.

Tsai S. J., Liu H. C., Liu T. Y., Wang Y. C. and Hong C. J. (1999). Association analysis of the 5-HT<sub>6</sub> receptor polymorphism C267T in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 276, 138-139.

Upton N., Chuang T. T., Hunter A. J. and Virley D. J. (2008). 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 5, 458-469.

Vacher B., Bonnaud B., Funes P., Jubault N., Koek W., Assie M. B., Cosi C. and Kleven M. (1999). Novel derivatives of 2-pyridinemethylamine as selective, potent, and orally active agonists at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Journal of medicinal chemistry* 42, 1648-1660.

Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., van de Voorde A., Martin J. J. and Cras P. (1993). Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of neurochemistry* 61, 1828-1834.

Varma A. R., Snowden J. S., Lloyd J. J., Talbot P. R., Mann D. M. and Neary D. (1999). Evaluation of the NINCDS-ADRDA criteria in the differentiation of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 66, 184-188.

Varnas K., Thomas D. R., Tupala E., Tiihonen J. and Hall H. (2004). Distribution of 5-HT7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970. *Neuroscience letters* 367, 313-316.

Verdurand M., Berod A., Le Bars D. and Zimmer L. (2011). Effects of amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT1A receptors in the rat hippocampus. *Neurobiology of aging* 32, 103-114.

Verge D., Daval G., Marcinkiewicz M., Patey A., el Mestikawy S., Gozlan H. and Hamon M. (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6, 3474-3482.

Villemagne V. L., Mulligan R. S., Pejoska S., Ong K., Jones G., O'Keefe G., Chan J. G., Young K., Tochon-Danguy H., Masters C. L., et al. (2012). Comparison of 11C-PiB and 18F-florbetaben for Abeta imaging in ageing and Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 39, 983-989.

Visser P. J., Scheltens P., Verhey F. R., Schmand B., Launer L. J., Jolles J. and Jonker C. (1999). Medial temporal lobe atrophy and memory dysfunction as predictors for dementia in subjects with mild cognitive impairment. *Journal of neurology* 246, 477-485.

Visser P. J., Verhey F., Knol D. L., Scheltens P., Wahlund L. O., Freund-Levi Y., Tsolaki M., Minthon L., Wallin A. K., Hampel H., et al. (2009). Prevalence and prognostic value of CSF markers of Alzheimer's disease pathology in patients with subjective cognitive impairment or mild cognitive impairment in the DESCRIPA study: a prospective cohort study. *Lancet neurology* 8, 619-627.

Visser P. J., Verhey F. R., Hofman P. A., Scheltens P. and Jolles J. (2002). Medial temporal lobe atrophy predicts Alzheimer's disease in patients with minor cognitive impairment. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 72, 491-497.

von Bergen M., Friedhoff P., Biernat J., Heberle J., Mandelkow E. M. and Mandelkow E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5129-5134.

Wallin A. K., Hansson O., Blennow K., Londos E. and Minthon L. (2009). Can CSF biomarkers or pre-treatment progression rate predict response to cholinesterase inhibitor treatment in Alzheimer's disease? *International journal of geriatric psychiatry* 24, 638-647.

Ward R. P., Hamblin M. W., Lachowicz J. E., Hoffman B. J., Sibley D. R. and Dorsa D. M. (1995). Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 64, 1105-1111.

Waterhouse R. N. (2003). Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 5, 376-389.

Watson J., Collin L., Ho M., Riley G., Scott C., Selkirk J. V. and Price G. W. (2000). 5-HT(1A) receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *British journal of pharmacology* 130, 1108-1114.

Webb R. L. and Murphy M. P. (2012). beta-Secretases, Alzheimer's Disease, and Down Syndrome. *Current gerontology and geriatrics research* 2012, 362839.

Weinstein D., Magnuson D. and Lee J. (1996). Altered G-protein coupling of a frontal cortical low affinity [3H]8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin serotonergic binding site in Alzheimer's disease. *Behavioural brain research* 73, 325-329.

Wesolowska A. (2010). Potential role of the 5-HT6 receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical data. *Pharmacological reports : PR* 62, 564-577.

Westman E., Cavallin L., Muehlboeck J. S., Zhang Y., Mecocci P., Vellas B., Tsolaki M., Kloszewska I., Soininen H., Spenger C., et al. (2011). Sensitivity and specificity of medial temporal lobe visual ratings and multivariate regional MRI classification in Alzheimer's disease. *PloS one* 6, e22506.

Whitwell J. L., Josephs K. A., Murray M. E., Kantarci K., Przybelski S. A., Weigand S. D., Vemuri P., Senjem M. L., Parisi J. E., Knopman D. S., et al. (2008). MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 71, 743-749.

Winblad B., Jones R. W., Wirth Y., Stoffler A. and Mobius H. J. (2007). Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 24, 20-27.

Wischik C. and Staff R. (2009). Challenges in the conduct of disease-modifying trials in AD: practical experience from a phase 2 trial of Tau-aggregation inhibitor therapy. *The journal of nutrition, health & aging* 13, 367-369.



Wollen K. A. (2010). Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 15, 223-244.

Woolley M. L., Marsden C. A. and Fone K. C. (2004). 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 3, 59-79.

Xia C. F., Arteaga J., Chen G., Gangadharmath U., Gomez L. F., Kasi D., Lam C., Liang Q., Liu C., Mocharla V. P., et al. (2013). [(18)F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*.

Yoshioka M., Matsumoto M., Togashi H., Mori K. and Saito H. (1998). Central distribution and function of 5-HT<sub>6</sub> receptor subtype in the rat brain. *Life sciences* 62, 1473-1477.

Yu Y. W., Tsai S. J., Lin C. H., Hsu C. P., Yang K. H. and Hong C. J. (1999). Serotonin-6 receptor variant (C267T) and clinical response to clozapine. *Neuroreport* 10, 1231-1233.

Yun H. M., Kim S., Kim H. J., Kostenis E., Kim J. I., Seong J. Y., Baik J. H. and Rhim H. (2007). The novel cellular mechanism of human 5-HT<sub>6</sub> receptor through an interaction with Fyn. *The Journal of biological chemistry* 282, 5496-5505.

Yun H. M. and Rhim H. (2011). The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target. *Experimental neurobiology* 20, 159-168.

Zhang J. Y., Nawoschik S., Kowal D., Smith D., Spangler T., Ochalski R., Schechter L. and Dunlop J. (2003). Characterization of the 5-HT<sub>6</sub> receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> signaling using an enabling chimeric G-protein. *European journal of pharmacology* 472, 33-38.

Zhang X., Beaulieu J. M., Gainetdinov R. R. and Caron M. G. (2006). Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 6-11.

Zhuang Z. P., Kung M. P. and Kung H. F. (1994). Synthesis and evaluation of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl]piperazine (p-MPPI): a new iodinated 5-HT<sub>1A</sub> ligand. *Journal of medicinal chemistry* 37, 1406-1407.

Ziolko S. K., Weissfeld L. A., Klunk W. E., Mathis C. A., Hoge J. A., Lopresti B. J., DeKosky S. T. and Price J. C. (2006). Evaluation of voxel-based methods for the statistical analysis of PIB PET amyloid imaging studies in Alzheimer's disease. *NeuroImage* 33, 94-102.