



**HAL**  
open science

# Rôle et potentialités thérapeutiques des cellules T régulatrices dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

Dialy Cira Dansokho

► **To cite this version:**

Dialy Cira Dansokho. Rôle et potentialités thérapeutiques des cellules T régulatrices dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066384 . tel-01346975

**HAL Id: tel-01346975**

**<https://theses.hal.science/tel-01346975>**

Submitted on 20 Jul 2016

**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 DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Spécialité Immunologie**

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

**Rôle et Potentialités thérapeutiques des cellules T  
régulatrices dans la physiopathologie de la maladie  
d'Alzheimer**

Présentée par **Dialy Cira DANSOKHO**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'Université Pierre et Marie Curie

Dirigée par le Professeur **Pierre AUCOUTURIER**, Directeur de thèse

Co-encadrée par le Docteur **Guillaume DOROTHEE**

Présentée et soutenue publiquement le 02/11/2015 devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur <b>Guy GOROCHOV</b>	Président
Monsieur le Docteur <b>José BOUCRAUT</b>	Rapporteur
Monsieur le Docteur <b>David BLUM</b>	Rapporteur
Madame le Docteur <b>Séverine BOILLEE</b>	Examinatrice
Monsieur le Docteur <b>Serge NATAF</b>	Examineur

## TITRE

Rôle et potentialité thérapeutiques des cellules T régulatrices dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

## MOTS CLES

Maladie d'Alzheimer, cellules T régulatrices, cellules microgliales, immunothérapie

## TITLE

Role and therapeutic potential of T regulatory cells in pathophysiology of Alzheimer's disease

## KEY WORDS

Alzheimer's disease; regulatory T cells; microglial cells; immunotherapy

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'examiner et de juger mon travail. J'espère que vous avez pris autant de plaisir à lire ce manuscrit que moi à l'écrire, malgré de nombreux moments de doute.

Je remercie mon Directeur de thèse, le Pr Pierre Aucouturier pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci de ta gentillesse.

Je remercie chaleureusement le Dr Guillaume Dorothée pour m'avoir encadrée et guidée durant toutes ces années. Je te remercie pour ta patience, ta compréhension, ton ouverture d'esprit, et ton soutien tout au long de cette thèse. Celle-ci représentait aussi un autre défi pour toi (si si !), celui de comprendre le langage « Cira » qui, j'avoue, n'est pas d'une très grande simplicité. Et rien que pour cela je te dis chapeau !

Thomas Chaigneau, je tiens à te remercier pour ton implication dans mon projet, pour toutes ces heures passées dans le froid du cryostat et tes têtes à tête avec le microscope. Je te remercie aussi pour ton soutien pendant les périodes difficiles que j'ai connues.

Au reste de l'équipe, Carole Elbim, Marine Chapey, Yannick Chantran, Yuan Dong, je vous remercie pour votre aide, vos conseils, votre soutien, nos fous rires et tous les autres bons moments que nous avons passés ensemble.

Je remercie tous mes autres collègues du Centre de Recherche, qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

Je remercie de tout cœur mes proches, pour leur présence et leur soutien. Merci de m'avoir soutenue pendant mes fréquents moments de doute et de vous être si souvent retenus de vouloir m'étriper pendant toutes ces années... Merci pour tout !

# RESUME

La MA est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive de la mémoire et des capacités d'apprentissage, et définie par deux types de lésions pathologiques principales : les "dégénérescences neurofibrillaires" composées d'agrégats intracellulaires de protéine Tau hyperphosphorylée, et les "plaques séniles" qui sont des dépôts amyloïdes extracellulaires de peptide A $\beta$ . La MA est également caractérisée par une neuroinflammation chronique associée au recrutement et l'activation d'astrocytes et de cellules microgliales. Les approches d'immunothérapie constituent des stratégies thérapeutiques prometteuses dans la MA. L'immunisation ciblant le peptide A $\beta$  montre une clairance des plaques et l'atténuation des troubles cognitifs dans des modèles murins de la maladie. Cependant, un premier essai clinique de vaccination anti-A $\beta$  (AN1792) a été arrêté après la survenue, chez 6% des patients, de méningoencéphalites imputées à l'activation de réponses T anti-A $\beta$  pro-inflammatoires. Par ailleurs, des études récentes suggèrent un effet bénéfique de certaines populations de cellules T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ . Enfin, plusieurs travaux suggèrent une implication des réponses lymphocytaires T dans la physiopathologie de la maladie. L'ensemble de ces données suggère des rôles complexes, potentiellement bénéfiques mais aussi délétères, de différentes réponses lymphocytaires T au cours de la MA, et souligne la nécessité de mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie de la maladie ainsi que les mécanismes de leur régulation. Notre équipe a précédemment montré que les cellules régulatrices (Tregs) contrôlent de façon critique l'amplitude des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ . Néanmoins, leur rôle dans la physiopathologie de la MA reste indéterminé.

L'objectif principal de ce travail a été d'étudier l'impact des Tregs sur la progression de la maladie dans un modèle murin APPPS1. Les résultats montrent ainsi que la déplétion transitoire des Tregs à l'aide d'un anticorps anti-CD25 accélère l'apparition des troubles cognitifs chez les souris APPPS1, sans altérer la pathologie amyloïde. Ces observations sont corrélées avec une réduction du recrutement des cellules microgliales autour des plaques A $\beta$  et une altération du profil d'expression, dans le cerveau des souris, de certains gènes impliqués dans la maladie. A l'inverse, dans le même modèle murin, l'amplification sélective des réponses Tregs par administration de faibles doses d'IL2 entraîne une augmentation du recrutement des cellules microgliales autour des dépôts amyloïdes et une amélioration des fonctions cognitives.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle bénéfique des Tregs au cours de la maladie d'Alzheimer et encourage le développement d'approches d'immunothérapie basée sur leur modulation.

# ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and cognitive functions. Accumulation of A $\beta$  peptide is considered the initiating cause of pathogenic lesions, and immunotherapy strategies targeting A $\beta$  represent promising therapeutic approaches. Vaccination against A $\beta$  provided encouraging results in experimental mouse models and, to a lesser extent, in a subsequent clinical trial (AN1792). Although the AN1792 trial had to be interrupted due to meningoencephalitis attributed to pro-inflammatory T cell responses in 6% of the patients, preclinical murine models did not show evidence of T cell-related side effects. In addition, several reports suggest that A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cells may be implicated in the natural course of AD and could have a strong therapeutic potential as well, pointing out the need for better understanding the role and regulation of T cell responses to A $\beta$ .

We previously showed that regulatory T cells (Tregs) control A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in physiological and pathological settings upon vaccination.

The aim of this work was to analyze the impact of Tregs on the natural course of the disease progression in a mouse model of AD.

Early transient depletion of Tregs accelerated the onset of cognitive deficits in APPPS1 mice. This result was correlated with less recruitment of microglia towards amyloid deposits and altered disease-related gene expression profile. Conversely, Tregs selectively amplifying resulted in higher numbers of plaque-associated microglia and improved cognitive functions in APPPS1 mice. These data suggest a beneficial role of Tregs in the pathophysiology of AD by modulating microglial response. Our study highlights the therapeutic potential of Treg-based immunotherapies in AD.

*A ma famille à qui je dois tout*

# ABBREVIATIONS

AAC : Angiopathie amyloïde cérébrale  
ACh : acétylcholine  
AChE : acétylcholinestérase  
ADAM: A Disintegrin and A metalloproteinase  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid Receptors  
Aph1: Anterior pharynx defective  
APP: Amyloid precursor protein  
APPL: Amyloid Precursor Like Protein  
APOE: apolipoprotein E  
BACE:  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme  
BCR: B Cell Receptor  
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor  
CDR : Clinical Dementia Rating  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CFA : Complete Freund Adjuvant  
CTF : C Terminal Fragment  
CTLA4 : cytotoxic T lymphocyte Antigen 4  
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes  
DAMPs : Danger-Associated Molecular Patterns  
DCs : Dendritic Cells  
DNFs : dégénérescences neurofibrillaires  
EAE: Experimental Autoimmune Encéphalomyelitis  
ECE: endothelin converting enzyme  
EOFAD: early onset familial Alzheimer's disease  
FDG: Fluorodeoxyglucose  
FTDP: Frontotemporal Dementia and Parkinsonism  
Foxp3: Forkhead box protein 3  
GFAP: Glial fibrillary acidic protein  
GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor  
GSK: glycogen synthase kinase  
GWAS: genome wide association studies  
IATI: Innostest Amyloid Tau Index  
ICOS Inducible T cell costimulator  
IDE: insulin degrading enzyme  
IGF1: Insulin Growth Factor 1

IFN: Interferon  
IL : Interleukine  
IRM : Imagerie à résonance magnétique  
KPI: Kunitz Protease Inhibitor  
LCR: Liquide céphalo rachidien  
LDLR: low-density lipoprotein receptor  
LRP1: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1  
LT: Lymphocyte T  
LTP: Long term potentiation  
LOAD: late onset Alzheimer's disease  
MA: Maladie d'Alzheimer  
MCI: Mild cognitive impairment  
MMSE : Mini Mental State Examination  
MMP : matrix metalloproteinase  
MP : Maladie de Parkinson  
NLRs: Nod-like receptors  
NMDARs: N-methyl-D-aspartate Receptors  
NO: Oxyde Nitrique  
PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PHFs: Paired Helical Filaments  
PIB: Pittsburgh Compound B  
PRR: Pathogen Recognition Receptor  
PSEN: préséniline  
RAGEs: receptor for advanced glycation endproducts  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SEP : Sclérose en plaque  
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique  
SNC : Système Nerveux Central  
SR : Scavenger receptors  
TCR : T Cell Receptor  
TEP : Tomographie par Emission de Positons  
TGF: Tumor Growth Factor  
Th: T helper  
TNF: Tumor Necrosis Factor  
TLR: Toll Like Receptor  
Treg: Cellule T régulatrice

TREM2: triggering receptor expressed on myeloid cells 2

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>14</b>
<b>I. LA MALADIE D'ALZHEIMER : ASPECTS HISTORIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES .....</b>	<b>14</b>
A. Définition .....	14
B. La découverte de la maladie .....	15
C. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer .....	16
<b>II. ASPECTS CLINIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....</b>	<b>17</b>
A. Les manifestations cliniques.....	17
B. Les différents stades de la maladie.....	18
1. Stade asymptomatique .....	18
2. Stade MCI.....	19
3. La phase de démence.....	20
C. Le diagnostic .....	20
1. Le bilan neuropsychologique.....	21
2. Diagnostic différentiel .....	22
a. L'imagerie cérébrale.....	23
b. Les Biomarqueurs.....	24
<b>III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....</b>	<b>26</b>
A. Les caractéristiques neuropathologiques de la MA .....	26
1. La pathologie amyloïde .....	26
a. La protéine précurseur amyloïde .....	26
b. Le catabolisme de l'APP et la formation des dépôts amyloïdes .....	27
c. L'effet pathogène du peptide amyloïde .....	29
d. La topographie de la pathologie amyloïde au cours de la MA.....	31
2. La pathologie Tau .....	32
a. La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires .....	32

b.	La progression topologique des lésions dans le cerveau .....	33
3.	Les autres lésions associées à la MA.....	34
<b>B.</b>	<b>Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>36</b>
1.	Les facteurs génétiques.....	36
2.	Les facteurs environnementaux .....	37
a.	L'âge .....	37
b.	Les maladies vasculaires et le diabète .....	38
c.	Le régime alimentaire .....	38
<b>C.</b>	<b>Les hypothèses physiopathologiques sur l'origine de la maladie.....</b>	<b>40</b>
1.	L'hypothèse de la cascade amyloïde .....	40
2.	Les autres hypothèses .....	41
a.	L'hypothèse cholinergique.....	42
b.	L'hypothèse de la pathologie Tau .....	42
c.	Autres hypothèses.....	42
<b>IV.</b>	<b>MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....</b>	<b>43</b>
<b>V.</b>	<b>LES APPROCHES THERAPEUTIQUES .....</b>	<b>48</b>
A.	Les traitements actuels.....	48
B.	Les autres stratégies thérapeutiques (hors immunothérapies) .....	49
C.	Les immunotherapies anti A $\beta$ .....	50
1.	Les immunothérapies actives et les leçons tirés de l'essai clinique AN1792.....	50
2.	Les immunothérapies passives .....	53
3.	Les immunothérapies anti-Tau .....	54
<b>VI.</b>	<b>LE SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE SNC .....</b>	<b>55</b>
A.	Cerveau et immunité.....	55
1.	Le Système Nerveux Central .....	55
a.	Les Barrières .....	56
b.	Les cellules immunitaires résidentes du SNC .....	58
2.	Le SNC, un organe « immunoprivilégié ».....	61
3.	La communication entre le SNC et le système immunitaire .....	62

B.	Les réponses immunitaires dans le SNC .....	64
1.	Les réponses immunitaires innées .....	64
2.	Les réponses immunitaires adaptatives .....	67
3.	Immunosenescence et SNC .....	71
4.	Inflammation systémique et neuroinflammation .....	72
C.	Implication du système immunitaire dans les maladies neurodégénératives	73
<b>VII.</b>	<b>LES REPONSES IMMUNITAIRES AU COURS DE LA MA ...</b>	<b>74</b>
A.	Les réponses innées au cours de la MA .....	74
B.	Les réponses adaptatives au cours de la MA .....	77
1.	Les réponses humorales .....	77
2.	Les réponses cellulaires .....	78
3.	Caractérisation et plasticité des cellules T régulatrices .....	80
4.	Les fonctions effectrices des cellules T régulatrices .....	83
5.	Rôle de l'IL2 et de ses récepteurs dans le développement et la fonction des Tregs .....	85
6.	Les cellules T régulatrices dans le SNC et au cours de la MA.....	86
	<b>OBJECTIFS &amp; RESULTATS .....</b>	<b>89</b>
<b>I.</b>	<b>Objectif .....</b>	<b>90</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>93</b>
A.	Article1: Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology.....	93
B.	Résumé des résultats .....	130
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>140</b>

<b>I. ANNEXE1: Article 2 Vaccine-induced A<math>\beta</math>-specific CD8+ T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease .....</b>	<b>141</b>
<b>II. ANNEXE 2: Curriculum Vitae .....</b>	<b>157</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>161</b>

# INTRODUCTION GENERALE

# I. LA MALADIE D'ALZHEIMER : ASPECTS HISTORIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES

## A. Définition

La MA est une maladie neurodégénérative, dont l'incidence ne cesse d'augmenter. C'est la principale cause de démence à l'heure actuelle. Il existe des formes familiales (1%) et des formes sporadiques (99%). Sur le plan neuropathologique, la maladie est caractérisée par deux types de lésions : les plaques séniles qui sont des dépôts extracellulaires du peptide amyloïde  $A\beta$  et les dégénérescences neurofibrillaires qui correspondent à des agrégats intra-neuronaux de protéines tau hyperphosphorylées. La maladie est également caractérisée par une atrophie cérébrale et une neuroinflammation chronique médiée par les cellules microgliales et les astrocytes entourant les dépôts amyloïdes (Figure 1).

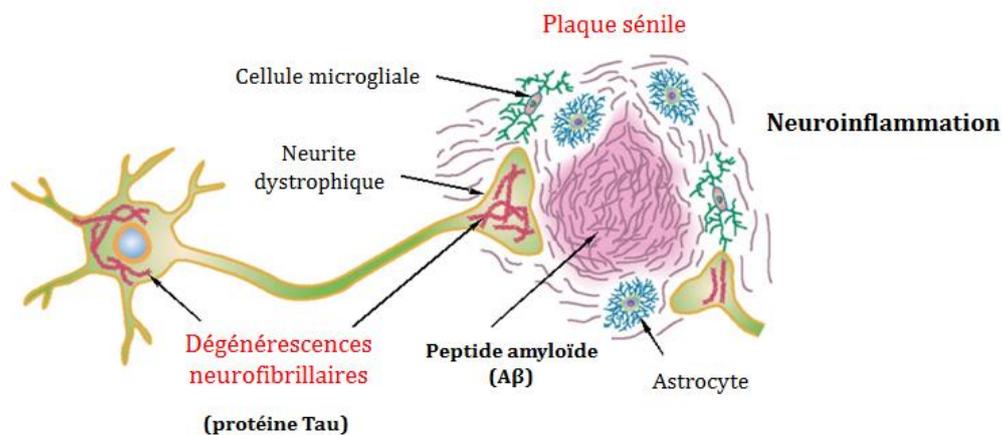


Figure 1: Caractéristiques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer. Figure adaptée de [Wong *et al.* 2002]

La maladie commence probablement 20 à 30 ans avant l'apparition des symptômes et différentes zones cérébrales sont progressivement et irréversiblement atteintes par les lésions [Bateman *et al.* 2012]. Cela entraîne une perte progressive et également irréversible des fonctions cognitives. La mémoire est la première fonction touchée, puis avec la progression de la maladie, surviennent les troubles de l'attention et/ ou les aphasies, les agnosies, les apraxies, les troubles des fonctions exécutives.

La MA affectant la cognition et le comportement, elle finit par handicaper le malade. Elle a également un lourd impact sur le plan socio-économique et est devenue aujourd'hui un véritable problème de santé publique en France comme dans le reste du monde.

## B. La découverte de la maladie

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois il y a maintenant plus de 100 ans lors de la 37<sup>e</sup> Conférence des psychiatres allemands à Tübingen en Allemagne. Les travaux présentés par Aloïs Alzheimer, neurologue, neuropathologiste et psychiatre allemand, lors de cette conférence lui ont valu sa renommée.

Le premier cas décrit est celui d'une patiente, Auguste Deter (Figure 2), admise à l'âge de 51 ans à l'asile psychiatrique de Francfort le 25 novembre 1901. Son état s'est dégradé au cours du temps, avec un changement graduel de sa personnalité. Ces changements, tels qu'Aloïs Alzheimer les a décrit, étaient d'abord associés à des troubles de la mémoire (formation de nouveaux souvenirs), et d'importantes dysfonctions psycho-sociales (paranoïa, jalousie, peur des personnes de son entourage). Elle présentait lors de son admission une désorientation temporelle et spatiale. Les troubles du langage sont apparus plus tard accompagnés d'une dégradation de l'état général de la patiente.

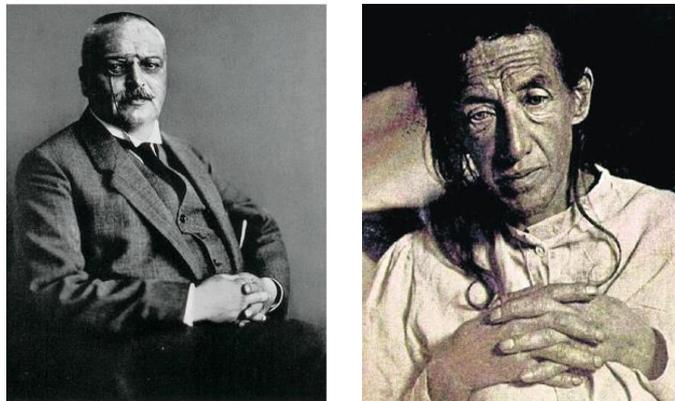


Figure 2 : Aloïs Alzheimer (1864-1915) et Auguste Deter (1850-1906) [Burns *et al.* 2002]

Au cours de la dernière année de sa vie, Auguste Deter est devenue totalement apathique. Elle mourut le 8 avril 1906 à l'asile psychiatrique de Francfort. L'examen *post-mortem* du cerveau de la patiente révèle une atrophie cérébrale et la présence de nombreuses plaques et des dégénérescences neurofibrillaires dans le cortex cérébral. L'observation d'autres cas similaires quelques années plus tard a suggéré la découverte d'une nouvelle maladie qui porte le nom d'Aloïs Alzheimer [Alzheimer *et al.* 1995;Goedert and Ghetti 2007]. Cet état de démence a longtemps été associé au vieillissement normal. Avec l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population mondiale, l'incidence de la maladie a

augmenté. Après la première description de la maladie en 1906, Alois Alzheimer et ses collègues étaient loin de se douter que cette maladie serait la principale cause de démence et représenterait aujourd'hui un véritable problème de santé publique. Au cours des trente dernières années, d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension de cette maladie. Cependant, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la maladie sont loin d'être bien comprises. Cela constitue un obstacle au développement de stratégies de diagnostic et de thérapie efficaces.

### **C. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer**

La démence est un syndrome acquis de déclin progressif des fonctions cognitives reflétant les zones cérébrales atteintes par la maladie. Elle peut être liée à plusieurs pathologies du cerveau chez les personnes âgées. Les causes les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer (MA, 50-75%), les démences vasculaires (DV, 20-30%), les démences fronto-temporales (DFT, 5-10%) et la démence à corps de Lewy (DCL, <5%). (*World Alzheimer's Disease report 2014, Alzheimer's Disease International*).

L'étude réalisée par Ferri et collaborateurs montre une variation de la prévalence de la démence selon les zones géographiques, liée au niveau de développement [Ferri *et al.* 2005]. Cette prévalence, toutes causes confondues, était de 44,5 millions en 2013. Avec le vieillissement de la population mondiale (espérance de vie moyenne de 71 ans) le nombre de personnes atteintes de démence atteindra 75,6 millions en 2030 et 135,5 millions en 2050 (*World 2014 Alzheimer's Disease International Report*). Par conséquent le nombre de démences liées à Alzheimer est estimé à environ 37,8 à 56,7 millions en 2030 et 67,7 à 101,6 millions en 2050.

La MA est à l'origine de 50 à 75% de ces cas de démence (diagnostics *post-mortem* inclus). L'incidence varie en fonction des groupes d'âge. Elle est 14 fois plus élevée chez les personnes âgées plus de 85 ans que chez les personnes âgées de 65 à 69 ans [Hebert *et al.* 1995].

La démence est un problème mondial. A l'heure actuelle, les pays développés comptent le plus grand nombre de cas de démence. Même si ces pays sont confrontés à ce problème depuis plus d'une centaine d'années, la charge socio-économique va s'alourdir dans les années à venir. Dans les pays pauvres ou en voie de développement, l'amélioration des soins de santé a permis de réduire l'incidence de maladies transmissibles. Cela a entraîné une augmentation de l'espérance de vie. La proportion de personnes âgées dans la population a donc augmenté et la prévalence de la démence va exploser dans les vingt prochaines années.

Le problème concernant ces pays réside dans le fait que la démence n'y est pas une priorité. Le manque de moyens financier, d'outils technologiques, et même de personnel qualifié font que peu de mesures y sont prises pour le diagnostic et la prise en charge des patients.

## **II. ASPECTS CLINIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER**

### **A. Les manifestations cliniques**

Sur le plan clinique, la MA est définie selon les symptômes suivants :

#### **– Une altération progressive de la mémoire**

Une altération progressive de la mémoire est caractéristique de la maladie. La mémoire est définie par l'enregistrement des informations (encodage), leur stockage (consolidation), leur restitution et récupération à la demande (rappel). Les patients atteints de la MA ont du mal à apprendre des informations nouvelles ou à se rappeler les informations apprises antérieurement. La mémoire épisodique est une forme de mémoire à court terme, de nouvelles informations sont enregistrées, stockées et restituées dans un délai court. Une altération de la mémoire épisodique, de la mémoire sémantique (mémoire des mots, des faits et des concepts) et de la mémoire de travail (espace de travail mental permettant la rétention de l'information à court terme), est observée aux stades précoces. Avec la progression de la maladie, d'autres formes de mémoire telles que la mémoire procédurale (connaissances implicites ou automatisme) sont altérées.

#### **– Une altération des fonctions d'exécution**

Elle se manifeste par une difficulté à raisonner, planifier, organiser, et exécuter des tâches complexes. Les fonctions exécutives peuvent être atteintes aux stades précoces de la maladie.

#### **– Un trouble de la reconnaissance des objets (agnosie)**

La capacité à reconnaître, à se représenter et à saisir la signification d'un objet par l'un des sens (toucher, vision...) est altérée, malgré l'absence de déficit sensitif ou sensoriel et en absence d'un affaiblissement intellectuel important.

– **La perturbation du langage (aphasie)**

Elle affecte l'expression ou la compréhension orale, écrite ou gestuelle. Elle survient en dehors de tout déficit sensoriel, ou de dysfonctionnement de la musculature laryngo-pharyngée.

– **Trouble dans les fonctions visuo-spatiales**

Les fonctions mentales permettant la distinction par la vue de la position relative des objets dans l'environnement ou par rapport à soi sont altérées.

– **Changement d'humeur et de personnalité**

Il se manifeste par de l'apathie et/ ou de la dépression et un retrait des activités sociales

## **B. Les différents stades de la maladie**

Les tests neuropsychologiques permettent seulement de poser un diagnostic de MA possible, probable ou de démence. Ces tests ne sont pas en mesure de détecter les phases les plus précoces de la maladie qui sont asymptomatiques et qui commencent bien des dizaines d'années avant l'apparition des premiers troubles cognitifs. D'autres outils de diagnostics tels que l'imagerie cérébrale pour la recherche de lésions neuropathologiques ainsi que les biomarqueurs dans le liquide céphalo rachidien (LCR) permettent de compléter ces données. On distingue trois principaux stades dans la MA :

### **1. Stade asymptomatique**

Aucun trouble cognitif n'est observé à ce stade (*Clinical Dementia Rating* CDR=0) bien que des lésions neuropathologiques caractéristiques de la MA soient présentes en faible proportion. C'est la phase la plus longue de la maladie. Elle commence plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie. Il est donc important de trouver des outils de prédiction de la transition du stade asymptomatique au stade suivant MCI (*mild cognitive impairment*). Dans une étude préliminaire, des scores de prédiction ont été générés parmi des sujets âgés avec des fonctions cognitives normales à l'aide d'un algorithme. Cet algorithme utilise des variables facilement accessibles auprès des praticiens (âge, sexe, nombre d'années d'études, antécédent familial, statut marital, historique médical...) afin de prédire la conversion du profil normal (sans trouble cognitif) à MCI [Pankratz *et al.* 2015]. Cette étude ouvre une voie vers de nouvelles méthodes de diagnostic plus rapides et plus précoces. Néanmoins, l'identification de biomarqueurs à valeur

diagnostique dès le stade asymptomatique, ou prédictif de la transition vers le stade MCI, reste un intense champ de recherche.

## 2. Stade MCI

Au cours du stade MCI, les patients présentent des déficits cognitifs légers (CDR=0,5) sans répercussion sur leur vie quotidienne, alors que la surface recouverte par les lésions neuropathologiques augmente [Morris *et al.* 2001]. C'est certainement la phase la plus difficile à définir. Plusieurs formes de MCI ont été décrites : des MCI amnésiques purs, les MCI avec altération de plusieurs fonctions cognitives (y compris la mémoire), les MCI avec plusieurs déficits cognitifs sauf la mémoire [Petersen 2004]. Ces différentes formes peuvent avoir une étiologie différente. Certains patients MCI restent stables et ne développeront jamais de syndromes démentiels, tandis que d'autres développent une MA (convertisseurs). Cette phase peut également être un prélude à d'autres atteintes cérébrales telles que les démences fronto-temporales, les démences à corps de Lewy ou les pathologies cérébrovasculaires. Les tests neuropsychologiques permettent d'évaluer les fonctions cognitives atteintes, tandis que l'imagerie cérébrale aide à mieux déterminer l'étiologie. Les MCI amnésiques purs évoluent plus souvent en MA. Le stade pré-démontiel de la MA encore appelé « *prodromal AD* » fait référence à la phase symptomatique, avant la phase de démence liée à la MA, permettant de les distinguer des autres MCI. Cette phase prodromale est marquée par des troubles mnésiques modérés et la présence de biomarqueurs dans le LCR et/ou des données d'imageries suggérant des modifications pathologiques caractéristiques de la MA.

La classification du groupe MCI est très controversée. C'est un groupe très hétérogène. Plusieurs paramètres sont pris en compte dans des recherches cliniques et peuvent être des sources de biais au moment de l'inclusion des sujets: l'homogénéisation des tests utilisés pour évaluer les fonctions cognitives, les fonctions cognitives évaluées (fonctions exécutives, l'attention, le langage, la mémoire, les fonctions visuo-spatiales, activités de la vie quotidienne), l'âge des patients, les critères de diagnostics de référence, durée de suivi des patients...[Petersen *et al.* 2014]. Il n'existe pas de profils neuropathologiques et cliniques spécifiques à ce stade, cela limite le diagnostic et la possibilité d'identifier les risques de progression vers un stade de démence.

### **3. La phase de démence**

C'est la dernière phase, facilement identifiable. Un patient atteint de démence de type Alzheimer présente des troubles cognitifs multiples sévères (atteinte de la mémoire et d'au moins une autre fonction telle que le langage, l'attention, les fonctions exécutives...). C'est la phase la plus handicapante, ces troubles cognitifs s'accompagnant d'une perturbation dans la réalisation des tâches quotidiennes.

L'évolution de la MA n'est pas linéaire. La maladie commence des dizaines d'années avant l'apparition des premiers symptômes, évolue lentement au stade asymptomatique et rapidement aux stades plus sévères. La progression de la maladie n'est pas homogène. Certains patients évoluent rapidement vers des stades sévères, tandis que d'autres évoluent plus lentement. La progression de la maladie peut être influencée par un certain nombre de paramètres tels que l'âge, le sexe, la sévérité des troubles comportementaux... [Neumann *et al.* 2001].

#### **C. Le diagnostic**

En France, la maladie d'Alzheimer est sous diagnostiquée. La difficulté du diagnostic précoce est due d'une part, au fait que chez les personnes âgées, les maladies sont fréquentes et progressives. Il est difficile de déterminer le début de leur apparition et très souvent ces maladies sont associées à un vieillissement « normal ». D'autre part, la première phase asymptomatique de la maladie ne facilite pas le diagnostic précoce chez les sujets plus jeunes. De plus, au moment de leur consultation, les sujets se plaignent déjà de troubles de mémoire et se trouvent donc à un stade symptomatique de la maladie (MCI) [Cantegreil-Kallen *et al.* 2004].

Depuis une trentaine d'années, avec l'augmentation rapide de la prévalence de la MA, il y a eu une prise de conscience et des progrès ont été réalisés dans la description des différents troubles cognitifs associés à la maladie. Différents critères de diagnostic ont été mis en place. Le diagnostic de la MA repose sur les critères définis par le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux (DSM-5) de l'Association Américaine de Neuropsychologie [Sachdev *et al.* 2014; Simpson 2014] et le National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA). Les deux systèmes présentent de nombreuses similarités et proposent une procédure en deux étapes : un classement des sujets selon la sévérité des troubles cognitifs, et ensuite une recherche de l'étiologie permettant de poser un diagnostic de MA possible,

probable ou certaine. Les critères du NINCDS-ADRDA sont plus détaillés, ciblés sur le diagnostic de la MA et plus orientés pour une application en recherche clinique [Dubois *et al.* 2007;McKhann *et al.* 2011;Sachs-Ericsson and Blazer 2015]. Les critères du DSM-5 reconnaissent l'existence d'un stade pré-démontiel et sont plus axés vers un diagnostic clinique, non seulement pour la MA mais également d'autres maladies impliquant des troubles cognitifs et d'autres formes de démence. Dans cette cinquième édition, la démence est appelée « troubles neurocognitifs majeurs » et le stade MCI est appelé « troubles neurocognitifs modérés ».

Les critères de diagnostic pour la MA sont les suivants : un trouble initial de la mémoire épisodique (rapporté et avéré) associé à des critères secondaires, tels qu'une atrophie des structures temporales internes, une modification des taux de biomarqueurs dans le LCR (liquide céphalo-rachidien). Un profil TEP (tomographie par émission de positons) spécifique ou une mutation autosomale dominante dans la famille directe peut également contribuer au diagnostic.

## **1. Le bilan neuropsychologique**

Le but de l'examen neuropsychologique est d'évaluer l'ensemble des fonctions cognitives principales. Les paramètres habituellement évalués sont : les fonctions cognitives globales, la mémoire, les fonctions exécutives, les activités fonctionnelles de la vie quotidienne, les troubles psycho-comportementaux. Cet examen permet de détecter des démences et de les distinguer d'un état anxieux, des troubles psychiatriques et des dépressions. Il est également mis en place pour un suivi du patient et une évaluation de la progression de la maladie après confirmation d'un diagnostic de démence. Il est réalisé par un personnel compétent, tel que les psychologues / neuropsychologues dans les services de neurologie ou gériatrie.

Le bilan neuropsychologique repose principalement sur l'évaluation des troubles cognitifs à l'aide d'une très grande variété de tests standardisés dont la spécificité est limitée.

- Le *Mini-Mental State Examination* (MMSE) ou test de Folstein est l'outil d'évaluation des déficits cognitifs le plus habituellement utilisé. Il est rapide à utiliser et est répandu dans le monde entier. Le test est constitué d'une série de 30 questions permettant d'évaluer le fonctionnement cognitif global. Un point est affecté à chaque réponse correcte, le score maximum étant de 30 (fonctions cognitives intactes). Un score  $26 > \text{MMSE} > 19$  suggère une démence légère, un score de  $18 < \text{MMSE} < 11$  suggère une démence modérée, un score de

10<MMSE<0 suggère une démence sévère [Folstein *et al.* 1975;Cockrell and Folstein 1988;Derouesne *et al.* 1999]. Ce test comporte néanmoins des limites. Il est fortement influencé par le niveau social et culturel du patient. De plus, il s'agit d'une estimation très générale. Les scores faibles ne sont pas spécifiques de la MA et les scores élevés correspondant aux formes légères sont confondus avec les plaintes fréquentes de troubles de la mémoire au cours du vieillissement. Ce test peut être combiné à d'autres, afin d'augmenter la précision des résultats.

- Le *Clinical Dementia Rating* (CDR) est une échelle permettant de détecter la présence de démence et de classer les patients selon la sévérité. Six paramètres sont évalués : la mémoire, l'orientation spatio-temporelle, le jugement et la résolution des problèmes, le comportement socioprofessionnel, le comportement à la maison et l'hygiène personnelle. Le score résulte de la synthèse de l'ensemble des six catégories et correspond à un niveau de sévérité : CDR=0 (pas de démence), CDR=0,5 (démence très légère, stade MCI), CDR=1 (démence légère, potentiellement stade MCI), CDR= 2 (démence modérée), CDR= 3 (démence sévère) [Morris 1993;Galvin *et al.* 2005]. Ces deux premiers tests ainsi que l'ADAS-Cog (*Alzheimer's Disease Assessment Scale Cognitive subsecton*) [Raghavan *et al.* 2013] permettent d'évaluer des fonctions cognitives globales.

D'autres tests permettant d'explorer des fonctions cognitives particulières atteintes lors de la MA peuvent également être utilisés au cours de l'examen neuropsychologique. L'épreuve des 5 mots [Dubois *et al.* 2002], et le test de Grober et Buschke (RL-RI16) [Grober *et al.* 1988] permettent d'évaluer la mémoire épisodique et verbale. Le test de l'horloge permet d'évaluer les fonctions exécutives et les praxies visuo-constructives [Lee *et al.* 2011].

L'ensemble de ces tests ne permet pas de poser un diagnostic certain de la MA. Un diagnostic définitif n'est obtenu qu'après la réalisation d'une autopsie.

## **2. Diagnostic différentiel**

Les troubles cognitifs observés découlent de la dégénérescence de zones cérébrales particulières. De plus, de nombreuses autres pathologies ont des manifestations cliniques similaires à celles de la MA. Une analyse plus poussée et plus précise est donc essentielle afin de trouver l'étiologie des troubles et de distinguer la MA des autres maladies. L'analyse *post-mortem* des cerveaux de patients MA permet de poser un diagnostic définitif. En revanche, elle donne peu ou pas d'informations concernant la localisation des premières lésions ni leur

progression dans le cerveau. Des techniques d'imageries sont utilisées pour répondre à cette problématique.

### **a. L'imagerie cérébrale**

L'imagerie joue un rôle important dans la recherche de l'étiologie des maladies neurodégénératives. Les techniques les plus couramment utilisées sont l'imagerie par résonance magnétique (IRM, imagerie structurale) et la tomographie par émission de positons (TEP, imagerie fonctionnelle). Ce sont des techniques non invasives permettant de détecter les lésions *in vivo*, utilisées dans le diagnostic et le suivi des patients MA.

L'IRM anatomique permet d'évaluer *in vivo* la perte neuronale dans des régions cérébrales spécifiques impliquées dans la MA, telles que l'hippocampe et le cortex entorhinal. Cette technique a permis d'obtenir des données importantes concernant la neuroanatomie de patients MA et de suivre l'évolution progressive de la maladie dès le stade pré-démence MCI [Convit *et al.* 1997; Bobinski *et al.* 2000]. D'autres techniques plus sensibles sont utilisées afin d'augmenter la précision du diagnostic et de détecter de faibles modifications dans le cerveau non visibles par IRM. C'est le cas de la TEP, qui est une technique d'imagerie moléculaire utilisant des molécules biologiquement actives faiblement radiomarquées pour cibler et visualiser des interactions biologiques *in vivo*. Les composés les plus couramment utilisés sont le fluor-18 fluorodeoxyglucose ( $[^{18}\text{F}] \text{FDG}$ ) et le Carbone-11 Pittsburgh Compound B ( $^{11}\text{C}\text{-PiB}$ ). Le FDG est un analogue du glucose. Le FDG-PET permet d'évaluer le métabolisme du glucose cérébral reflétant l'activité cérébrale. Une baisse du métabolisme du glucose (perte neuronale) dans les régions temporo-pariétales du côté droit (excepté dans les ganglions basaux, le thalamus, le cervelet et le cortex primaire sensoriel et moteur) est caractéristique de la MA [Villemagne *et al.* 2008].

Le  $^{11}\text{C}\text{-PiB}$  se fixe sur des dépôts fibrillaires amyloïdes, mais aussi à d'autres lésions contenant le peptide amyloïde  $\text{A}\beta$  telle que l'angiopathie amyloïde cérébrale. Le  $^{11}\text{C}\text{-PiB}\text{-PET}$  permet de localiser spécifiquement les dépôts amyloïdes comme le montre la Figure 3 et d'évaluer leur densité [Klunk *et al.* 2004].

D'autres ligands permettant de suivre la progression des dégénérescences fibrillaires en se fixant sur les formes pathologiques de la protéine Tau sont également en cours d'évaluation pour une utilisation *in vitro* et *in vivo* [James *et al.* 2015].

La neuroinflammation est une caractéristique pathologique majeure de la maladie. Elle peut également être quantifiée au cours du processus de diagnostic par TEP à l'aide de ligands radio-marqués ciblant les TSPO (*translocator protein*) ou PBR (*peripheral benzodiazepine*

*receptors*). Ce sont des protéines mitochondriales impliquées dans le transport du cholestérol. Leur expression augmente fortement dans les macrophages et cellules microgliales activés [Karlstetter *et al.* 2014]. Différents ligands de TSPO à visée de diagnostic ont été développés [ $^{18}\text{F}$ -PBR111,  $^{11}\text{C}$ -PBR28,  $^{11}\text{C}$ -(R)-PK11195, Ro5-4864. Certains ligands tels que le  $^{11}\text{C}$ -(R)-PK11195 montrent des effets bénéfiques dans la résolution de l'inflammation. Par conséquent, leur utilisation dans le cadre de maladies neurodégénératives a été suggérée [Rupprecht *et al.* 2010].

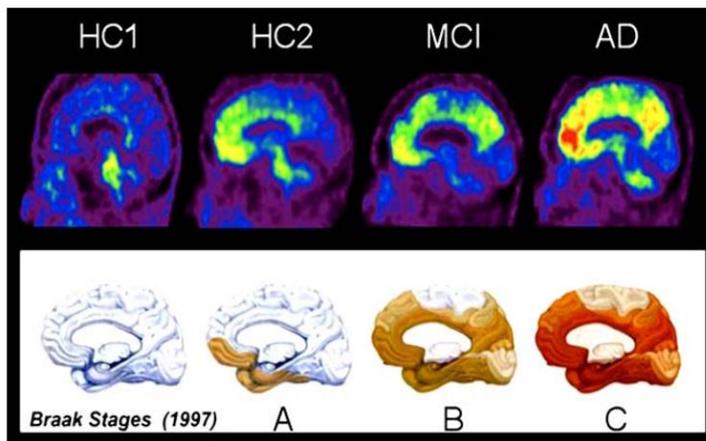


Figure 3: Représentation des images de PiB-PET montrant la fixation du  $^{11}\text{C}$ -PiB reflétant la charge amyloïde dans le cerveau de sujets contrôles sains (HC1 et 2), un patient MCI, et un patient MA et (panel inférieur) (panel supérieur). Cette représentation est corrélée aux différents stades de la progression de la pathologie amyloïde proposée par Braak. Image tirée de (Klunk et al., 2004)

Toutes ces techniques sont complémentaires et permettent de comprendre les altérations anatomiques et fonctionnelles au cours de la MA [Buckner *et al.* 2005]. L'inconvénient des techniques de TEP est qu'elles ne sont pas très accessibles et sont très coûteuses pour une étude clinique.

### **b. Les Biomarqueurs**

Une autre façon d'augmenter la précision du diagnostic de la MA dans les stades précoces de la maladie (asymptomatique et MCI) est l'utilisation de biomarqueurs. Ces marqueurs de la maladie sont principalement recherchés dans deux principaux compartiments, le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Le LCR est en contact direct avec l'espace extracellulaire du cerveau et reflète l'état physiologique et pathologique du système nerveux central. Toute modification biochimique ou cellulaire du cerveau devrait ainsi affecter sa composition. Les plaques amyloïdes sont constituées de peptide  $\text{A}\beta$ , tandis que les DNFs sont formées d'agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées. À l'heure actuelle, les peptides  $\text{A}\beta$ , la protéine Tau et Tau phosphorylée (P-Tau) présentes dans le LCR sont les meilleurs biomarqueurs validés dans le diagnostic la

MA. L'A $\beta$ 42 (peptide de 42 acides aminés) et la protéine Tau sont exprimés dans le cerveau de sujets sains dans des conditions physiologiques. Une expression anormalement faible de l'A $\beta$ 42 (environ 50% inférieure à la normale) combinée à une expression anormalement élevée de la protéine Tau dans le CSF, sont corrélées avec des lésions amyloïdes et des DNFs dans le parenchyme cérébral. Ces critères ont été suggérés pour discriminer les patients MA des sujets sains [Strozyk *et al.* 2003;Tapiola *et al.* 2009], et prédire l'évolution du stade MCI vers la MA [Fagan *et al.* 2007;Brys *et al.* 2009]. L'index IATI (*Innotest Amyloid Tau Index*) est un score largement utilisé dans les études cliniques et permet, par la combinaison des deux biomarqueurs (A $\beta$ 42, Tau et P-Tau), une discrimination entre MCI et d'autres troubles cognitifs liés au vieillissement ou à d'autres pathologies. L'index IATI est le rapport de la concentration d'A $\beta$ 42 mesurée sur la concentration d'A $\beta$ <sub>42</sub> relative. L'A $\beta$ 42 relatif est calculé à partir des concentrations de protéines Tau. Un sujet normal a un IATI >1 tandis qu'un IATI <1 est en faveur du diagnostic de MA [Hulstaert *et al.* 1999].

D'autres marqueurs pertinents reflétant les autres mécanismes de la maladie (stress oxydatif, neuroinflammation, perte neuronale) ont également été proposés, mais les recherches ont donné des résultats variables. D'autres protéines non spécifiques de la maladie ont été suggérées, en complément de l'A $\beta$  et de Tau dans le diagnostic des formes présymptomatiques de la MA : *la visinin-like protein 1* (VILIP-1, dégénérescence neuronale et synaptique) et *la chitinase-3-like protein 1* (CHI3L1 ou YKL-40, inflammation) [Craig-Schapiro *et al.* 2010;Blennow *et al.* 2012;Tarawneh *et al.* 2015].

Bien que les biomarqueurs dans le LCR soient hautement spécifiques, le prélèvement du LCR par ponction lombaire reste une procédure invasive, difficile à réaliser dans une étude clinique à grande échelle et ne permet pas de faire un suivi régulier des sujets inclus. Le sang présente l'avantage d'être plus accessible et donc plus facile à prélever chez les patients et les sujets contrôles. Contrairement au LCR, le sang irrigue plusieurs organes, ce qui complique l'identification de marqueurs spécifiques de la MA. L'hétérogénéité des résultats obtenus concernant les mesures des niveaux d'A $\beta$ <sub>42</sub>, fait que la concentration plasmatique d'A $\beta$ <sub>42</sub> ne peut pas être considéré comme un marqueur sensible ni spécifique pour le diagnostic de la MA. Même si actuellement aucun marqueur n'a encore été validé, des méthodes d'analyses protéiques à haut débit ont permis d'identifier des panels de marqueurs impliqués dans l'inflammation, dans le métabolisme du cholestérol et le stress oxydatif. Tandis que certaines de ces études n'ont pas pu être confirmées [Ray *et al.* 2007], d'autres utilisent des données de plusieurs études et des algorithmes afin d'augmenter la précision des tests, mais les résultats restent néanmoins encore à être validés [Irizarry 2004;Rembach *et al.* 2015].

### III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

#### A. Les caractéristiques neuropathologiques de la MA

Les deux lésions neuropathologiques principales et caractéristiques de la MA sont les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs). Les plaques séniles sont dues à des dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes A $\beta$ . Les DNFs sont des agrégats intracellulaires de protéines tau hypersphosphorylées.

##### 1. La pathologie amyloïde

###### a. La protéine précurseur amyloïde

La pathologie amyloïde est caractérisée par des agrégats extracellulaires principalement constitués des peptides amyloïdes A $\beta$ . Les peptides A $\beta$  sont issus du catabolisme de la protéine précurseur amyloïde ou APP (*Amyloid Precursor Protein*). Cette dernière et ses homologues APLP1 et APLP2 (*Amyloid Precursor Like Protein*) sont des glycoprotéines de type I présentant une large portion extracellulaire, un domaine transmembranaire et une partie C-terminale appelée *APP Intracellular Domain* (AICD) [Muller and Zheng 2012a].

Le gène codant pour l'APP humaine est localisé sur le chromosome 21 et contient au moins 19 exons. Les exons 7, 8 et 15 subissent plusieurs épissages alternatifs qui aboutissent à la génération de plusieurs isoformes de longueurs variables. Le nom des différentes isoformes est désigné en fonction du nombre d'acides aminés (aa) qu'elles contiennent. Les isoformes les plus communes sont l'APP695, l'APP751 et l'APP770. Les deux dernières contiennent dans leur région extracellulaire un domaine inhibiteur de sérine protéases de type Kunitz (*Kunitz Protease Inhibitor*, domaine KPI), absent dans l'APP695. Le peptide A $\beta$  est commun aux 3 isoformes, alors que l'APP770 contient, en plus du domaine KPI, un domaine d'homologie avec l'antigène MRC-OX2 [Haass *et al.* 1991;Selkoe 2001].

Outre le domaine KPI, la séquence de l'APP est constituée de plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine extracellulaire contient des sites de liaison au zinc, au cuivre, et à l'héparine. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré leur implication dans le système nerveux, dans l'adhésion cellulaire, la survie neuronale, la synaptogenèse, la plasticité, le transport vésiculaire, l'hémostase...[Van Nostrand *et al.* 1990;Turner *et al.* 2003]. L'APP et l'APLP2 présentent des homologies sur toutes leurs séquences sauf en ce qui concerne la région A $\beta$ . Des études antérieures ont montré que des souris déficientes pour les protéines

APP, APLP1 ou APLP2 ne montrent que des affections variables mineures, tandis que les souris déficientes pour l'APP et l'APLP2, l'APLP1 et APLP2 ou L'APP et l'APLP1 développent des troubles du développement et meurent peu de temps après la naissance, ce qui suggère une redondance fonctionnelle possible parmi ces protéines, et leur importance dans le métabolisme et le développement [von Koch *et al.* 1997;Heber *et al.* 2000].

L'APP695 est préférentiellement exprimée dans le cerveau, tandis que les deux autres isoformes ont une expression ubiquitaire. Le ratio d'expression de l'ARNm des isoformes APP 770/ 751/ 695 dans le cerveau est de l'ordre de 1 : 10 : 20 [Tanaka *et al.* 1989]. Au niveau cellulaire, il a été montré *in vitro* que le ratio d'expression des trois isoformes est différent. Dans les astrocytes l'expression de l'APP 770/ 751/ 695 est de l'ordre de 2 : 4 : 1 [Gray and Patel 1993], tandis que dans les neurones, la forme prédominante est l'APP695.

L'absence ou la présence des domaines KPI et OX2 suggère une différence fonctionnelle. Des études ont montré que le domaine KPI joue un rôle dans le catabolisme de l'APP [Ho *et al.* 1996]. Une augmentation de l'expression de l'APP 770 dans le cortex occipital et temporal ainsi que dans l'hippocampe de patients MA a été rapportée [Tanaka *et al.* 1988]. D'autres études allant dans le même sens montrent une production accrue des formes contenant le domaine KPI avec l'âge et chez les patients MA [Preece *et al.* 2004]. Par ailleurs, des études récentes portant sur l'influence des récepteurs à NMDA (N-méthyl-D-aspartate) ou NMDARs sur la production de peptide amyloïde beta ( $A\beta$ ) ont été menées par plusieurs groupes de recherche. Les NMDARs sont impliqués dans des processus de plasticité synaptique donc de mémoire. Des résultats obtenus dans certaines de ces études montrent que l'activation prolongée des NMDARs extra-synaptiques peut augmenter la production des isoformes contenant le domaine KPI dans les neurones au détriment de l'APP 695, ainsi qu'une production accrue du peptide  $A\beta$  [Lesne *et al.* 2005;Bordji *et al.* 2010]. L'ensemble de ces données suggèrent qu'une dérégulation de l'épissage alternatif de l'APP pourrait contribuer à la pathogénèse de la maladie.

#### **b. Le catabolisme de l'APP et la formation des dépôts amyloïdes**

Dans le neurone, une fois produite, l'APP est transloquée dans le réticulum endoplasmique grâce à son peptide signal et suit une voie de sécrétion classique [Selkoe 1998]. Elle subit des modifications post-transductionnelles au cours de son acheminement vers la membrane plasmique. Ensuite la protéine APP mature est soumise à une succession de protéolyse. Le catabolisme de l'APP fait intervenir différentes sécrétases qui clivent de façon

séquentielle la protéine selon deux voies : non amyloïdogène et amyloïdogène (Figure 4).

- La voie non amyloïdogène (Figure 4, gauche) est initiée par l' $\alpha$ -sécrétase qui clive l'APP au niveau de la séquence du peptide A $\beta$  entre les acides aminés lysine16 et leucine17 et libère un fragment N-terminal soluble (sAPP $\alpha$ ), ainsi qu'un fragment C-terminal (APP-CTF $\alpha$ ) de 83 aa (C83), lui-même clivé par la  $\gamma$ -sécrétase. Le clivage du C83 par la  $\gamma$ -sécrétase libère un court fragment P3 et le fragment AICD. Ce dernier contient plusieurs sites de phosphorylation et est impliquée dans de multiples interactions protéine-protéine. Le fragment AICD a des propriétés de facteur de transcription [Cao and Sudhof 2001] ainsi que des fonctions de régulation de l'expression de facteurs impliqués dans la fonction neuronale et la plasticité synaptique [Muller *et al.* 2008].

Le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase est constitutif et prévient la production du peptide A $\beta$  pathologique. L' $\alpha$ -sécrétase est une glycoprotéine de type I, elle appartient à la famille des désintégrines et métalloprotéases ADAM (A Disintegrin and A Metalloproteinase). Trois  $\alpha$ -sécrétases ont été décrites ADAM9, 10 et 17. De nombreuses études montrent un rôle neurotrophique et synaptotrophique du fragment sAPP $\alpha$  et son implication dans des mécanismes de régulation cellulaire [Taylor *et al.* 2008].

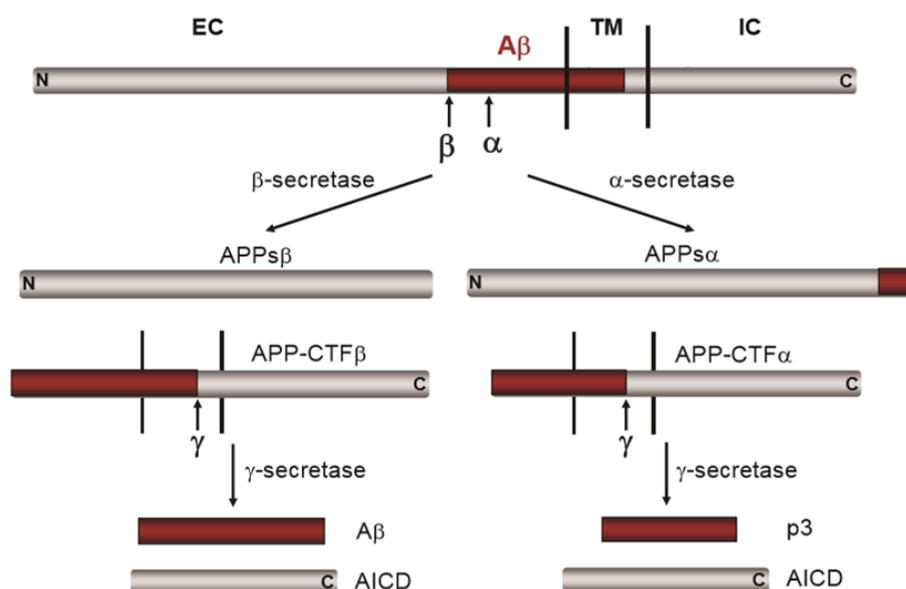


Figure 4: Protéolyse de l'APP, présentation de la voie non amyloïdogène et amyloïdogène [Zheng 2011].

- La voie amyloïdogène aboutit à la production du peptide A $\beta$  suite au clivage de l'APP par la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -sécrétase. La  $\beta$ -sécrétase, en compétition avec l' $\alpha$ -sécrétase, clive la protéine avant l'Aspartate 1 et libère un fragment APP soluble (sAPP $\beta$ ) et un fragment C-terminal (APP-CTF $\beta$ ) contenant 99aa (C99). Ce dernier est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase, qui cible plusieurs sites dans la partie C-terminale de l'APP (Figure 4, droite). Après clivage séquentiel, elle libère le fragment AICD et des peptides A $\beta$  de différentes tailles allant de 38 à 43 aa, selon le site de coupure. Les formes majoritaires libérées sont l'A $\beta$ 40 et l'A $\beta$ 42.

La  $\beta$ -sécrétase, également appelée BACE-1 ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*) est une protéase aspartique. La  $\gamma$ -sécrétase est un complexe multiprotéique composé de *l'anterior pharynx defective 1* (Aph1), la *presenilin enhancer 2*, la nicastrine et de ses composantes enzymatiques actives, les présénilines 1 et 2 (PSEN1 et PSEN2). Les mutations des gènes PSEN1, PSEN2 ou APP, à l'origine des formes familiales de MA, altèrent le métabolisme de l'APP et/ou la longueur du peptide A $\beta$  généré, aboutissant à une surproduction de formes pathogènes.

### c. L'effet pathogène du peptide amyloïde

Les plaques amyloïdes ou plaques séniles, sont majoritairement constituées de fibrilles (contenant des structures en feuillet  $\beta$ ). Le peptide A $\beta$ 42 est plus hydrophobe que le peptide A $\beta$ 40 et par conséquent, il est plus prône à former des fibrilles. Certaines études montrent que le peptide A $\beta$  aurait dans des conditions physiologiques un rôle neurotrophique, de protection contre les espèces réactives de l'oxygène [Plant *et al.* 2003;Lopez-Toledano and Shelanski 2004]. En revanche, des niveaux d'expression élevés du peptide A $\beta$ , notamment suite à une altération de sa clairance, entraînent une cascade d'évènements toxiques aboutissant à l'altération de l'activité neuronale, de la transmission et la plasticité synaptique et de la mémoire [Palop and Mucke 2010;Roberson *et al.* 2011]. Dans les conditions physiologiques, le peptide A $\beta$  est éliminé selon trois voies principales (Figure 5) :

- par des récepteurs Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1), récepteurs des produits de glycation avancés (RAGES)..., exprimés à la surface des cellules gliales et les neurones présents dans le parenchyme cérébral

- à travers la barrière hématoencéphalique ou le liquide céphalorachidien

- par dégradation par des endopeptidases produites par les cellules gliales et les neurones : insulin degrading enzyme (IDE), neprilysine, endothelin converting enzyme (ECE) [Nalivaeva *et al.* 2014].

Les cellules microgliales expriment à leur surface des récepteurs tels que les *Toll like receptors* TLR2/ 4 et les RAGEs reconnaissant les peptides A $\beta$  [Wang *et al.* 2015].

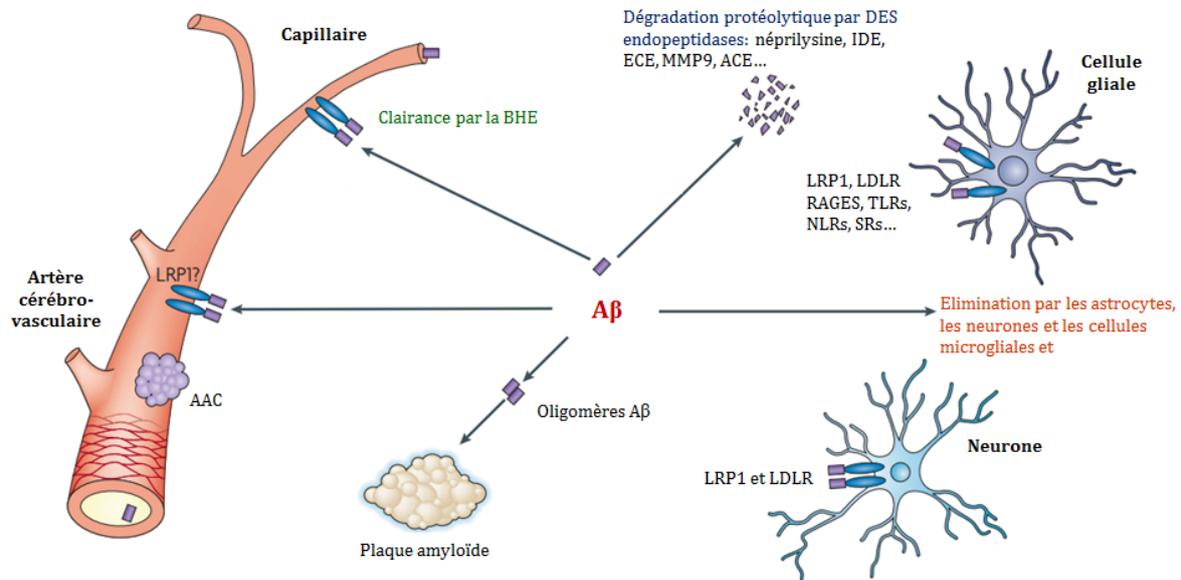


Figure 5: Différents mécanismes de clairance des peptides amyloïdes AAC: Angiopathie Amyloïde Cérébrale, A $\beta$ : peptide Amyloid  $\beta$ , BHE: Barrière Hémato Encéphalique, ECE: Endothelin Converting Enzyme, IDE: Insulin Degrading Enzyme, LCR: Liquide Céphalo-Rachidien, LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor, LRP1: Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1, MMP9: Matrix MetalloProteinase 9, NLRs: Nod-Like Receptors, RAGEs: récepteurs des produits de glycation avancés, SR: Scavenger Receptors. Figure adaptée de [Bu 2009a]

Les plaques amyloïdes sont entourées de neurites dystrophiques dans lesquels on trouve des filaments de protéines Tau hyperphosphorylées, mais également des cellules microgliales et des astrocytes activés. L'ensemble est appelé plaque neuritique ou plaque sénile. Les plaques sont détectées par immunohistochimie avec du rouge Congo ou de la thioflavin S qui reconnaissent les structures en feuillet  $\beta$ . Elles peuvent également être marquées avec des anticorps dirigés contre le peptide A $\beta$ .

La formation des plaques passe par différents états intermédiaires d'assemblage du peptide A $\beta$ 42 : monomères, oligomères, protofibrilles et fibrilles. Les fibrilles s'agrègent et forment des plaques. Plusieurs données indiquent que les formes oligomériques solubles sont les plus neurotoxiques. Elles sont plus solubles que les plaques et plus petites. Ces formes oligomériques ont été retrouvées dans le cerveau et le liquide céphalorachidien de patients

MA et altèrent la plasticité synaptique [Cleary *et al.* 2005;Klyubin *et al.* 2008;Viola and Klein 2015].

Les voies amyloïdogène et non amyloïdogène sont en compétition. La pathologie amyloïde serait due à un déséquilibre entre ces deux voies. Une activation accrue de la voie amyloïdogène ou une altération du processus d'élimination du peptide amyloïde A $\beta$  (principal constituant des plaques amyloïdes) entraîne la survenue de dépôts amyloïdes [Luo *et al.* 2001;Haass 2004;Postina *et al.* 2004;Muller and Zheng 2012b]. Par conséquent, les différentes composantes du catabolisme de l'APP constituent des cibles de choix dans la plupart des stratégies de diagnostic et de thérapie en cours d'investigation.

#### d. La topographie de la pathologie amyloïde au cours de la MA

Les dépôts amyloïdes sont progressifs au cours de la MA et touchent plusieurs formations corticales et hippocampiques. L'évolution des dépôts amyloïdes permet de distinguer trois grandes phases [Braak and Braak 1991]. Au stade précoce (Figure 6A), les dépôts amyloïdes commencent par les portions basales des lobes temporaux, frontaux et occipitaux et sont absents de l'hippocampe. Au stade modéré (Figure 6B), la densité des dépôts augmente. Les dépôts se propagent sur toutes les aires associatives du néocortex et atteignent légèrement l'hippocampe. Au stade avancé (Figure 6C), les dépôts finissent par envahir tout le néocortex y compris les aires sensorielles et motrices primaires. A ce stade, les dépôts retrouvés dans l'hippocampe sont les mêmes que ceux décrits au stade précédent.

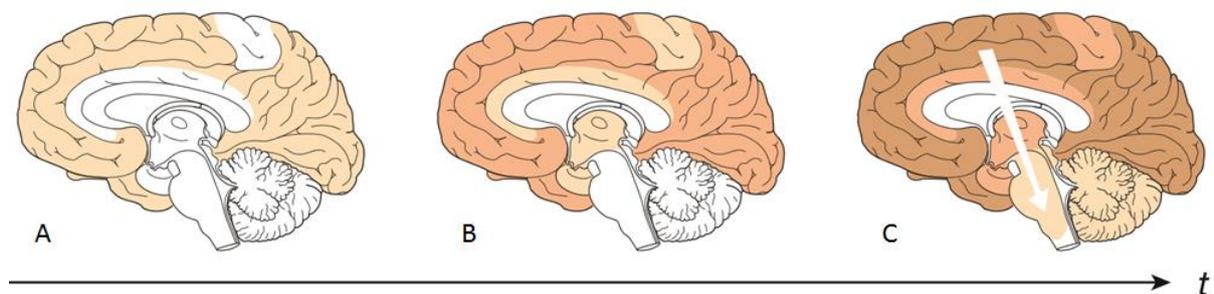


Figure 6: Distribution des dépôts amyloïdes dans le cerveau aux différents stades de la maladie. L'intensité des couleurs indique l'augmentation de la densité des plaques les zones cérébrales. [Jucker and Walker 2013]

## **2. La pathologie Tau**

### **a. La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires**

La protéine Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules. Le gène codant pour la Tau humaine est localisé sur le chromosome 17 [Weingarten *et al.* 1975]. Il existe 6 isoformes exprimées dans le cerveau humain adulte. Ces isoformes sont issues de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, contenant 3 (R3) ou 4 (R4) répétitions de motifs d'interaction avec les microtubules. La force de l'interaction stabilisatrice avec les microtubules dépend du nombre de répétitions. En outre, plus la protéine est phosphorylée, moins il y aura d'interaction avec les microtubules [Buee *et al.* 2000]. La protéine Tau est principalement exprimée dans les neurones au niveau des axones et à des proportions plus faibles dans les dendrites. Elle est également présente dans les oligodendrocytes en quantité plus faible [Klein *et al.* 2002]. La protéine Tau est impliquée dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules dans les neurones et, par son association avec d'autres molécules, dans l'intégrité de multiples fonctions cellulaires telles que la motilité, la signalisation cellulaire, la morphologie, structure et maintien du neurone, le transport, la neurotransmission, la formation des synapses...

La protéine Tau est une protéine phosphorylée contenant 85 sites de phosphorylation (résidus sérine, thréonine et tyrosine). Un très grand nombre de phosphatases et de kinases régulent sa phosphorylation dans des conditions physiologiques et pathologiques. Les mécanismes entraînant l'agrégation de la protéine Tau ne sont pas très bien connus. Il semblerait qu'un déséquilibre entre les activités kinases et phosphatases ciblant la protéine Tau soit l'une des causes possibles de son hyperphosphorylation. Une fois hyperphosphorylée, la protéine non repliée à l'état natif, adopte une conformation anormale et ne peut plus se lier aux microtubules, ni les stabiliser. Plusieurs protéines hyperphosphorylées s'assemblent alors en filaments double hélice et forment des agrégats insolubles [Cowan and Mudher 2013].

La pathologie Tau est caractérisée par des dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) constituées majoritairement de ces agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées. Ces lésions sont retrouvées dans un groupe de pathologies neurodégénératives appelées tauopathies telles que la MA, la maladie de Pick, les démences frontotemporales associées à un syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17), ainsi que les tauopathies pures [Goedert and Spillantini 2011].

Dans le cadre de la MA, ces filaments pathologiques, constituants des DNFs sont appelés PHFs (*paired helical filaments*) et sont toxiques pour les neurones. La progression des lésions et leur localisation dans le cerveau se superposent assez bien avec les pertes neuronales observées et corrèlent avec l'évolution des signes cliniques. De plus de nombreuses études montrent que la pathologie Tau et les dépôts amyloïdes ne sont pas des évènements indépendants dans la MA. Il a été montré par exemple que la *glycogen synthase kinase-3* (GSK-3), une kinase jouant un rôle clé dans la régulation de l'activité de Tau, régule l'activité de BACE1 (impliquée dans le catabolisme de l'APP) et favorise la production du peptide A $\beta$  [Ly *et al.* 2013]. De plus, dans des modèles murins de la maladie, la co-expression de la protéine Tau et de l'APP entraîne une aggravation des dégénérescences neurofibrillaires [Lewis *et al.* 2001] et une déficience en protéine Tau prévient l'altération des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie (APP23) [Ittner *et al.* 2010].

### b. La progression topologique des lésions dans le cerveau

Braak E. et Braak H. décrivent différents stades dans la progression des DNFs dans le cerveau. Au stade transentorhinal (Figure 7A), on retrouve les DNFs dans le cortex transentorhinal et entorhinal, et très peu au niveau du CA1 de l'hippocampe. L'isocortex n'est pas affecté par les lésions à ce stade.

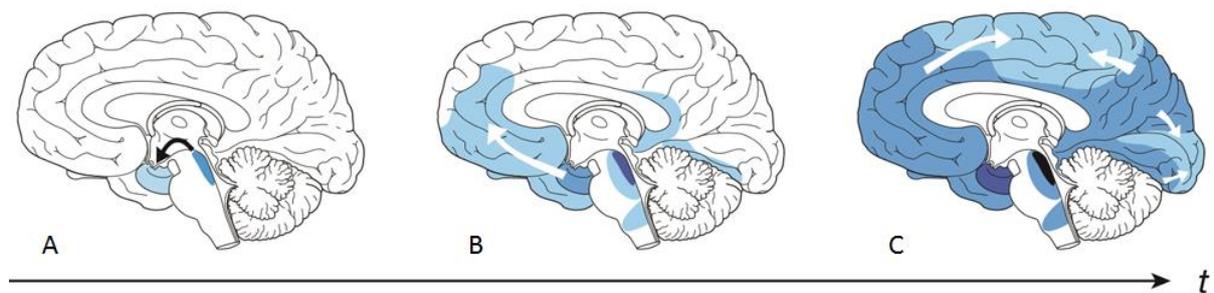


Figure 7: Distribution de la pathologie Tau dans le cerveau aux différents stades de la maladie. L'intensité des couleurs indique l'augmentation de la densité des lésions dans les zones cérébrales. (Jucker and Walker, 2013)

Le stade limbique (Figure 7B) est caractérisé par une augmentation des DNFs dans le cortex transentorhinal et entorhinal, une augmentation modérée dans l'hippocampe. Le stade isocortical (Figure 7C), montre une aggravation des lésions précédentes et une atteinte sévère de l'hippocampe et de l'isocortex (Figure 7).

### 3. Les autres lésions associées à la MA

La MA est également associée à des lésions vasculaires dont la principale est l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). Cette dernière est caractérisée par des dépôts de peptides amyloïdes, principalement l'A $\beta$ 40, dans les parois vasculaires au niveau des méninges et du cortex cérébral [Viswanathan and Greenberg 2011]. L'AAC entraîne des micro-hémorragies intra-cérébrales localisées principalement dans les régions lobaires. Les hémorragies touchant les autres zones du cerveau (ganglions basaux, cervelet), sont pour la plupart dues à de l'hypertension. Elle est présente dans plus de 95% des cas de MA et prend donc une part importante dans la maladie. L'AAC n'est pas spécifique à la MA. Elle est également présente chez près de 30% de sujets âgés sains ( $\geq 60$  ans) et la prévalence augmente avec l'âge [Vernooij *et al.* 2008].

Le métabolisme lipidique est également altéré au cours de la MA. Des altérations biochimiques des lipides ont été signalées dans les analyses *post-mortem* de cerveau de patients MA. Toutefois, le lien entre métabolisme lipidique et MA n'a été clairement établi qu'une fois l'allèle  $\epsilon 4$  de l'apolipoprotéine E (APOE) identifié comme étant le premier facteur de risque génétique des formes sporadiques. APOE4 régule le métabolisme du cholestérol dans le cerveau. L'APP, BACE1 et la  $\gamma$ -sécrétase sont des protéines membranaires. Leur trafic et leur activité protéolytique sont donc fortement influencés par la composition et les propriétés biochimiques de la membrane dans laquelle elles sont intégrées. Il a été montré que les rafts lipidiques constitués de cholestérol et de sphingolipides favorisent le clivage de l'APP par la voie amyloïdogène et la formation d'oligomères d'A $\beta$  [Di and Kim 2011].

Une dysfonction et une perte des neurones cholinergiques sont habituellement observées chez les patients MA au niveau des lobes temporaux, notamment dans l'hippocampe et le cortex entorhinal. L'acétylcholine (ACh) est le neurotransmetteur libéré durant la transmission cholinergique, il se lie aux récepteurs localisés sur les autres fibres cholinergiques. Les cholinestérases présentes dans les fentes synaptiques, notamment l'acétylcholinestérase (AChE), diminuent la concentration d'ACh par hydrolyse. Des observations cliniques ainsi que la localisation histologique des innervations cholinergiques suggèrent que la neurotransmission cholinergique joue un rôle important dans les phénomènes de plasticité synaptique et de mémoire [Bloem *et al.* 2014]. Ces lésions seraient présentes chez les patients à des stades histopathologiques précoces, avant même l'apparition des symptômes. De plus, des données précédentes suggèrent que la dégénérescence des neurones cholinergiques accélère la formation de plaques amyloïdes [Laursen *et al.* 2013].

Les synapses glutamatergiques sont également atteintes au cours de la maladie. Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur impliqué dans plusieurs fonctions cérébrales. Le glutamate et les récepteurs glutamatergiques tels que les NMDARs (*N-methyl-D-aspartate Receptors*) et AMPARs (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid Receptors*) jouent un rôle critique dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire à travers la potentialisation à long terme (LTP). La LTP est un renforcement de la transmission synaptique entre deux neurones qui perdure dans le temps, suite à leur stimulation synchrone. Un taux élevé de glutamate est toxique, il entraîne une stimulation excessive des NMDARs, une forte augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et une cascade d'évènements toxiques aboutissant à la mort neuronale. Ce phénomène est appelé excitotoxicité. Il a été montré que le peptide Aβ, notamment dans sa forme oligomérique, augmente la libération de glutamate par les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales, entraînant une augmentation de la concentration de glutamate dans la fente synaptique. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau entraînerait une diminution de l'expression des AMPARs au niveau des axones, et une altération de la LTP [Rudy *et al.* 2015].

Une réaction neuroinflammatoire chronique est une des caractéristiques observées chez les patients MA et dans les modèles murins de la maladie. Elle est médiée par les cellules microgliales et les astrocytes entourant les plaques amyloïdes. Le rôle important de l'inflammation au cours de la MA est souligné par des données génomiques récentes indiquant une association entre certaines molécules du système immunitaire (TREM2, CD33...) et la susceptibilité à développer la maladie. Les cellules microgliales expriment à leur surface de nombreux récepteurs qui reconnaissent les peptides amyloïdes (CD14, CD36, TLR4) et sont impliquées dans la clairance des différentes formes du peptide Aβ. Les astrocytes sont également impliqués dans le processus inflammatoire et sont caractérisés par une augmentation de l'expression du GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). Les cellules microgliales et les astrocytes activés sont capables de libérer des molécules inflammatoires telles que les cytokines (TNFα, IL-1 et IL-6), les chémokines (CCL2, CCL4, CCL3...)...

La neuroinflammation est un mécanisme complexe faisant intervenir des acteurs centraux (astrocytes et cellules microgliales) et périphériques (macrophages, lymphocytes T, B...) et dont l'effet peut être bénéfique ou délétère suivant le stade de la maladie. L'ensemble de ces aspects sera plus amplement discuté dans une autre partie de ce manuscrit.

## B. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

### 1. Les facteurs génétiques

La MA est habituellement divisée en deux types de formes de la maladie : des formes familiales et des formes sporadiques. Les formes familiales à transmission autosomale dominante (EOFAD pour *early onset familial Alzheimer's disease*) sont plus précoces et plus rares, elles surviennent avant l'âge de 65 ans et représentent près de 1% des cas de MA. Les formes sporadiques (LOAD pour *late onset Alzheimer's disease*) sont plus tardives et surviennent à partir de 65 ans et représente près de 99% des cas.

La MA est une pathologie multifactorielle complexe. Plusieurs mutations sont associées aux formes précoces de la maladie et sont localisées pour la plupart sur le gène de l'APP (chromosome 21) dans la région codant pour le peptide A $\beta$ , dans le gène de la PSEN1 (chromosome 14) et la PSEN2 (chromosome 1). Ces mutations entraînent l'augmentation du ratio A $\beta$ <sub>42</sub>/ A $\beta$ <sub>40</sub>. Les mutations survenant dans le gène de la PS1 dans ces formes autosomales, sont plus fréquentes que celles affectant l'APP et la PSEN2. Les mutations dans la région A $\beta$  affectent le clivage de la protéine APP par la  $\beta$ - ou la  $\gamma$ -sécrétase. La découverte de ces mutations dans les formes familiales ont suggéré un rôle central de la pathologie amyloïde dans la MA. Plusieurs mutations dans le gène de l'APP ont été identifiées dans différentes familles : swedish (K670N/M671L) (dans le site de clivage de la  $\beta$ -sécrétase), Indiana (V717F) et London (V717I) (dans le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase), arctique (E693G) et dutch (E693Q) (dans la séquence du peptide A $\beta$ )...

Il est maintenant bien établi qu'une composante génétique est impliquée dans la pathogenèse de la LOAD. Le premier gène de susceptibilité majeure à avoir été validé est celui de l'apolipoprotéine E  $\epsilon$ 4 (APOE allèle 4).

L'APOE est une lipoprotéine intervenant dans le transport du cholestérol et d'autres lipides dans le cerveau. Elle est exprimée par les astrocytes et un peu moins par les cellules microgliales. Il existe plusieurs isoformes qui diffèrent d'un seul acide aminé chez l'homme : APOE  $\epsilon$ 2, APOE  $\epsilon$ 3 et APOE  $\epsilon$ 4. APOE4 est moins efficace dans le transport du cholestérol que les autres isoformes. Elle est impliquée dans près de 20-25% des cas de LOAD. Sa présence est également associée à l'AAC [Vernooij et al., 2008], la pathologie Tau, l'athérosclérose, la sclérose en plaque et la maladie de Parkinson [Bu 2009b].

Le gène de l'APOE4 n'est ni un prérequis, ni une cause suffisante pour développer la maladie, mais sa présence augmente de 3 à 15 fois le risque de développer la maladie [Corder

*et al.* 1993]. L'âge de début de la maladie et la progression seraient également influencés par l'APOE4 [Kurz *et al.* 1996]. L'interaction entre le LRP1 et l'APP accélère le trafic de cette dernière dans les endosomes et son clivage, aboutissant à une production rapide de peptides A $\beta$ .

Des études génomiques récentes telles que les GWAS (*genome wide association studies*) ont révélé plusieurs autres gènes d'association à la maladie. Ces gènes sont impliqués dans un certain nombre de voies de signalisation aboutissant à la régulation du catabolisme de l'APP ou de la phosphorylation de la protéine Tau, accélérant ainsi l'apparition et la progression de la maladie [Chouraki and Seshadri 2014]. ABCA7, tout comme l'APOE est impliqué dans le métabolisme lipidique. Mais il a été récemment montré que ce gène serait plus impliqué dans la régulation de la phagocytose que le métabolisme lipidique [Malik *et al.* 2015]. PICALM, BIN1, CD2AP sont impliqués dans les mécanismes d'endocytose et de transport axonal. De façon intéressante, un bon nombre de gènes connus pour jouer un rôle dans les réponses immunitaires sont associés à la maladie : TREM2, CD33, HLA-DRB5/ B1(CMH de classe II), CLU, CR1, EPHA1, MS4A4A, MS4A6E [Lambert *et al.* 2013a;Steinberg *et al.* 2015]. Ces données soulignent l'implication du système immunitaire dans la physiopathologie de la MA. Des études apportant de nouvelles preuves de l'implication de la protéine Tau dans la pathogenèse de la MA ont été récemment publiées. Les résultats de ces recherches révèlent l'existence d'un nouveau locus de susceptibilité près de celui de la protéine Tau sur le chromosome 17 [Jun *et al.* 2015].

## **2. Les facteurs environnementaux**

Ils sont majoritairement impliqués dans la survenue des formes sporadiques et regroupent habituellement les facteurs socio-démographiques tels que l'âge, niveau d'étude, mode de vie, la cigarette ou l'alcool et les facteurs biologiques tels que la survenue d'hypertension ou de diabète (Figure 8). Certains de ces facteurs environnementaux sont abordés ici.

### **a. L'âge**

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la survenue des formes sporadiques de la MA, les plus communes. L'âge est le premier facteur de risque de la MA. Le vieillissement est caractérisé par une altération progressive des fonctions physiologiques. L'accumulation des dommages non réparés rend les organismes plus susceptibles aux maladies et à la mort

[Kirkwood 2008]. Les fonctions mitochondriales sont progressivement dégradées entraînant ainsi une augmentation de la production de radicaux libres.

Très récemment il a été montré qu'un facteur de transcription REST (*repressor element 1-silencing transcription factor*), faiblement exprimé dans le cerveau de jeunes personnes, est fortement exprimé dans les cerveaux âgés. En revanche, son expression est fortement réduite dans le cerveau des patients MCI et MA. REST régule des gènes impliqués dans la mort cellulaire et la résistance au stress, et est également associé à la préservation des fonctions cognitives. Cette étude suggère un rôle protecteur de REST contre les altérations liées au vieillissement causant des dommages aux neurones [Lu *et al.* 2014]. L'expression faible de ce facteur protecteur, chez les patients MCI et MA suggère une vulnérabilité de leurs fonctions cérébrales face aux altérations liées à l'âge.

L'un des effets les plus reconnus du vieillissement est la dérégulation du système immunitaire. La compétence immunitaire est affaiblie (immunosénescence) avec une inflammation chronique à bas bruit (*inflammaging*) [Franceschi *et al.* 2000;Deleidi *et al.* 2015].

#### **b. Les maladies vasculaires et le diabète**

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique due à une production insuffisante ou à une résistance à l'insuline. De plus en plus de données montrent un lien entre le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et la susceptibilité à développer la MA. La prévalence de ces pathologies ne cesse d'augmenter avec l'âge.

Les lésions vasculaires cérébrales sont également associées à la MA. Les dysfonctions des vaisseaux sanguins dans le cerveau et une baisse de la pression sanguine entraîneraient une hypoperfusion du cerveau et une altération de la délivrance des nutriments au cerveau et de la clairance des peptides A $\beta$ .

Le diabète et les maladies cardiovasculaires sont fortement favorisés par une mauvaise alimentation, l'obésité et le manque d'activité physique. Une étude récente, dans un modèle murin de la maladie, a montré que l'obésité augmente la phosphorylation de la protéine Tau et aggrave le déficit cognitif [Leboucher *et al.* 2013].

#### **c. Le régime alimentaire**

Des études suggèrent que le régime alimentaire et une activité sportive régulière réduiraient le risque de développer la MA [Barnard *et al.* 2014].

De nombreux régimes alimentaires dont le but est de contrer l'augmentation du stress oxydatif et de réduire la charge en cholestérol ont été décrits. Ces différents régimes sont à base d'aliments riches en antioxydants (vitamines,  $\beta$ -carotènes, sélénium...) et pauvres en acides gras saturés (Oméga-3). Celui qui soulève plus d'intérêt est le régime méditerranéen qui serait associé non seulement à une diminution du risque de développer la maladie mais également à une réduction de la mortalité due à la MA. Il est à base de poisson, de fruits, de légumes, de céréales, de pommes de terre, de noix, peu de viande rouge et de produits laitiers [Scarmeas *et al.* 2006; Scarmeas *et al.* 2007]. La caféine et la théine (ainsi que les polyphénols contenus dans le thé) réduiraient la charge amyloïde, la phosphorylation de la protéine Tau et auraient un effet bénéfique sur le déclin cognitif [Dragicevic *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013; Laurent *et al.* 2014].

Une activité physique et une activité cognitive régulières seraient également des facteurs protecteurs. Une activité physique régulière est bien connue pour être le meilleur remède contre le vieillissement. De plus, de nombreuses études ont montré, dans des modèles murins de la maladie et chez des sujets âgés qu'une activité physique régulière permettrait de préserver les fonctions cognitives. Cet effet bénéfique passerait par une sécrétion de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et l'IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*) [Belarbi *et al.* 2011; Varma *et al.* 2015].

Les infections et l'inflammation systémique sont également impliquées dans le développement de la MA. Ces aspects seront développés dans un autre chapitre de ce manuscrit.

Dans 50 ans, l'estimation du nombre de cas de démences dont la MA dépassera 130 millions. Etant donné les difficultés actuelles pour diagnostiquer précocement la MA, il est important d'explorer d'autres pistes pour réduire son incidence. Améliorer le mode de vie de personnes âgées pourrait être le moyen d'éviter de développer les maladies cardiovasculaire et de retarder l'apparition de la maladie.

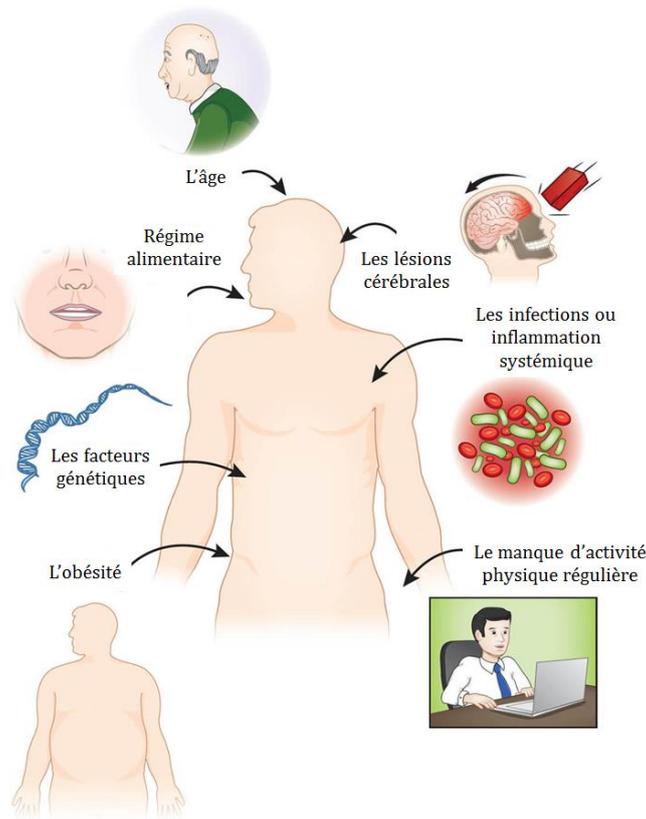


Figure 8: Exemples de facteurs de risque de la MA [Heneka *et al.* 2015b]

## C. Les hypothèses physiopathologiques sur l'origine de la maladie

### 1. L'hypothèse de la cascade amyloïde

Selon l'hypothèse amyloïde, le peptide A $\beta$  généré par la voie amyloïdogène serait à l'origine de la cascade d'évènements toxiques, y compris les DNFs, la perte neuronale, la neuroinflammation chronique, entraînant l'apparition des troubles cognitifs et de la démence dans les formes familiales et sporadiques [Hardy and Allsop 1991; Hardy and Higgins 1992]. Plusieurs arguments ont été en faveur de cette hypothèse. De nombreuses études ont montré que les mutations dans le gène de l'APP ou dans les gènes des protéines impliquées dans la production du peptide A $\beta$  sont responsables des EOFAD [Tanzi and Bertram 2005]. De plus, des données d'imagerie montrent une augmentation de la charge amyloïde chez des patients MA, mais également chez les personnes souffrant de trisomie 21 présentant trois copies du gène APP, qui finissent par développer la maladie d'Alzheimer au bout de 40 ou 50 ans. Des

modèles murins transgéniques exprimant l'APP humaine avec des mutations décrites chez les EOFAD présentent des dépôts amyloïdes et des troubles cognitifs.

Pendant des années cette hypothèse a occupé une place centrale dans la compréhension de la physiopathologie de la MA, mais également dans la recherche de stratégies thérapeutiques. Même s'il a été clairement établi que le peptide A $\beta$  dans toutes ses formes est impliqué dans la MA, est-il réellement à l'origine de la maladie, du moins en ce qui concerne les formes sporadiques ? Cette hypothèse est aujourd'hui remise en question, suite aux échecs successifs de nombreux essais cliniques ciblant le peptide A $\beta$  ou la  $\gamma$ -sécrétase.

Des résultats d'analyses post-mortem montrent la présence de dépôts amyloïdes dans les cerveaux de sujets âgés sains, suggérant que les dépôts amyloïdes seuls ne suffisent pas à induire la MA. De plus, l'évolution des troubles cognitifs est corrélée avec la progression des DNFs et non à celle de la pathologie amyloïde (Braak et Braak, 1991). Il faut admettre que la phase asymptomatique de la MA est caractérisée par la présence de plaques sans la manifestation d'aucun signe clinique, ce qui pourrait être le cas pour ces sujets sains présentant des plaques. En ce qui concerne la pathologie Tau d'une part, de nombreuses études ont montré que le peptide A $\beta$  pourrait causer la formation de PHFs, et d'autre part une mutation dans la protéine Tau n'entraîne pas la MA mais une autre maladie neurodégénérative la FTDP-17. Beaucoup d'arguments pertinents ont été avancés pour expliquer l'invalidité de l'hypothèse amyloïde. L'argument le plus solide de tous est en mon sens l'échec des stratégies thérapeutiques ciblant les peptides A $\beta$ . Si le peptide amyloïde était à l'origine de la MA, toutes les stratégies thérapeutiques visant à réguler sa production, devraient pouvoir être efficaces, au moins à des stades précoces de la maladie, ce qui est loin d'être le cas. Il manque donc un lien certain entre la pathologie amyloïde, les DNFs et les troubles cognitifs chez les patients atteints de formes sporadiques de la maladie. Plusieurs autres hypothèses ont été ainsi émises afin de répondre à cette problématique.

## **2. Les autres hypothèses**

La MA est une pathologie très complexe. L'hypothèse amyloïde semble être confirmée pour les formes familiales de la maladie. En revanche, en ce qui concerne les formes sporadiques, de plus en plus de chercheurs suggèrent que la pathologie amyloïde serait une conséquence, un marqueur, et non une cause de la maladie.

### **a. L'hypothèse cholinergique**

C'est l'une des premières hypothèses proposées pour expliquer l'étiologie de la maladie. Une réduction de l'activité choline acétyltransférase et acétylcholinestérase a été observée dans le cerveau de patients MA, comparée aux sujets sains. Des analyses de cerveaux *post-mortem* indiquent également une perte massive de fibres cholinergiques dans les zones cérébrales impliquées dans la mémoire et la cognition [Davies and Maloney 1976]. L'ensemble de ces données suggèrent que le système cholinergique est impliqué dans la physiopathologie de la MA. Cette théorie est à l'origine du développement d'approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de cholinestérase. Cependant ces traitements sont peu efficaces et ne ralentissent pas la progression de la maladie. Ces approches thérapeutiques seront développées ultérieurement dans ce manuscrit.

### **b. L'hypothèse de la pathologie Tau**

Elle suggère que la formation d'agrégats intracellulaires de la protéine Tau hyperphosphorylée serait à l'origine de la maladie. L'évolution des signes cliniques concorde plus avec la progression de la pathologie Tau qu'avec la pathologie amyloïde. De plus, cette théorie est également appuyée par le fait que ces lésions sont retrouvées dans plusieurs autres pathologies à démence. Des traitements basés sur cette hypothèse ont également été développés.

### **c. Autres hypothèses**

– Les mitochondries jouent un rôle primordial dans le métabolisme énergétique et le bon fonctionnement cérébral. Les cellules cérébrales ont un besoin élevé en énergie pour assurer les fonctions cognitives et sont fortement dépendantes des mitochondries. L'hypothèse de la cascade mitochondriale propose une détérioration progressive de la fonction mitochondriale avec l'âge, entraînant une altération des mécanismes moléculaires et cellulaires dans le cerveau aboutissant à l'accumulation des peptides A $\beta$ , des dégénérescences neurofibrillaires et un déclin des fonctions cérébrales [Picone *et al.* 2014;Swerdlow *et al.* 2014].

– L'hypothèse de la réponse adaptative au stress suggère que le peptide A $\beta$  et les différents éléments du catabolisme de l'APP seraient des composants d'un mécanisme de défense, une réponse adaptative mise en place par le cerveau en réponse à un stress. Des études montrent une augmentation de la production du peptide A $\beta$  ainsi que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau suite à un stress (ischémie cérébrale, stress oxydatif, stress du métabolisme lipidique...) [Castello and Soriano 2014].

#### IV. MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Les modèles animaux jouent un rôle central dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA et dans la recherche de traitements. Depuis l'identification de gènes impliqués dans la pathogénèse de la maladie et l'hypothèse amyloïde, plusieurs modèles animaux ont été générés. Des mutations retrouvées dans différentes familles ont été introduites dans ces modèles. Les signes cliniques de la LOAD n'étant pas différents de ceux de la EOFAD, les données mécanistiques obtenues dans ces modèles animaux apportent des informations également utiles sur les formes sporadiques.

Il existe un très grand nombre de modèles reproduisant un ou plusieurs mécanismes de la maladie. La plupart des modèles animaux sont murins et sont principalement simple (APP, PSEN ou MAPT), double (APP/PSEN ou APP/MAPT), triple (APP/ PSEN/ MAPT) ou multi (plusieurs mutations de l'APP, de la PSEN et/ ou de la MAPT) transgéniques. Ces modèles murins, dont certains sont présentés dans le Tableau 1, présentent plusieurs avantages :

- Analyser un grand nombre de paramètres neuropathologiques et fonctionnelles de la maladie : mécanismes liés à la pathologie amyloïde (APP23, APPPS1), la pathologie Tau et la perte neuronale (THY-Tau22, JNPL3), la neuroinflammation et les troubles cognitifs (apprentissage et mémoire).
- Etudier le lien existant entre la pathologie Tau et les dépôts amyloïdes.
- Tester différentes approches thérapeutiques ciblant la pathologie amyloïde ou la pathologie Tau, et visant à restaurer ou améliorer les fonctions cognitives.

Il existe également d'autres modèles non transgéniques de la maladie. Ils sont générés par injection directe du peptide A $\beta$  ou de la protéine Tau dans le cerveau. Ils permettent d'étudier l'effet des différentes formes du peptide A $\beta$  et de la protéine Tau phosphorylée dans des animaux pour lesquels on ne dispose pas de modèles transgéniques [Balducci and Forloni 2014]. Ils ont également permis de comprendre le rôle des formes solubles de l'A $\beta$  dans la physiopathologie de la maladie, et de contribuer à la compréhension des mécanismes de propagation de la pathologie amyloïde et la pathologie Tau.

Ces modèles transgéniques ou non présentent néanmoins des limites, ils sont incomplets, et donnent seulement une vision partielle des mécanismes impliqués dans la maladie retrouvés chez les patients. Les pertes neuronales et les DNFs, dont la progression est corrélée avec l'évolution des signes cliniques chez les patients, ne sont présentes que dans certains modèles de la maladie. L'intensité des lésions varie également entre les modèles, ce qui rend difficile

l'interprétation des résultats d'un modèle à un autre, notamment pour l'évaluation de l'efficacité de diverses approches thérapeutiques.

Le choix d'un modèle ou d'un autre dépend des problématiques étudiées. Plusieurs aspects sont à prendre en compte : le type et l'âge d'apparition des lésions neuropathologiques (tardif ou précoce) et des troubles cognitifs, le moment d'administration des traitements et les analyses.

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles pour l'étude de ces modèles.

Les lésions neuropathologiques sont détectées avec des méthodes d'immunohistochimie par coloration ou marquage avec respectivement du rouge Congo ou la thioflavine S. Ces deux marqueurs reconnaissent les structures en feuillet  $\beta$  présentes dans les plaques amyloïdes. Les techniques d'immunofluorescence utilisent des anticorps reconnaissant différents épitopes sur le peptide A $\beta$  (exemple clones BAM-10 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>) et 6E10(A $\beta$ <sub>1-16</sub>)) ou sur la protéine Tau (AT8 (Phospho-PHF-tau pSer<sub>202</sub>+Thr<sub>205</sub>), AT180 (anti-Phospho-PHF-tau pThr<sub>231</sub>)).

L'électrophysiologie permet par ailleurs d'évaluer la plasticité synaptique *in vivo* par implantation d'électrodes chez l'animal dans le gyrus denté et la région CA1 de l'hippocampe (siège de la mémoire) et *ex vivo* sur des coupes d'hippocampe. Ces électrodes envoient une stimulation électrique sur les neurones. Un potentiel d'action (dépoliarisation, modification du potentiel de membrane) est généré et se propage dans l'axone du neurone stimulé. L'arrivée de la dépoliarisation au niveau de la terminaison nerveuse déclenche la libération du neurotransmetteur (glutamate). Ce dernier active des récepteurs postsynaptiques (NMDA ou AMPA) par ouverture des récepteurs membranaires perméables aux ions. Un second messenger (comme le calcium) active des enzymes (kinases) et déclenche ainsi une cascade de signalisation dans le neurone.

L'efficacité et la durée de la transmission synaptique sont ainsi mesurées et permettent de mettre en évidence des mécanismes de LTP, impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. De nombreuses études ont montré une altération de la LTP dans des modèles murins de la maladie [Chapman *et al.* 1999], entraînant l'apparition des troubles d'apprentissage et de mémoire [Nalbantoglu *et al.* 1997]. Il a également été rapporté que les oligomères A $\beta$  peuvent bloquer l'induction de la LTP dans des coupes d'hippocampes chez le rat [Wang *et al.* 2002] et *in vivo* [Walsh *et al.* 2002]. Cet effet peut être bloqué en inhibant l'oligomérisation des peptides A $\beta$  [Walsh *et al.* 2005].

Les troubles cognitifs sont principalement étudiés à l'aide de tests comportementaux. Le labyrinthe de Barnes, le labyrinthe en Y, la piscine de Morris, le test de reconnaissance d'un nouvel objet, sont des tests permettant d'évaluer les fonctions d'apprentissage et de mémoire dans des modèles murins de la maladie [Webster *et al.* 2013] (Figure 9).

– Le labyrinthe en Y ou *Y maze* mesure la capacité de l'animal à explorer un nouvel environnement et la mémoire spatiale. Il est constitué de trois bras (A, B, C) distants les uns des autres de 120° (en Y). Lors de la première exploration, la souris est placée au milieu du labyrinthe, et l'accès à l'un des bras est bloqué, alors que la souris explore les deux premiers bras pendant un certain temps. Après une phase de rétention hors du labyrinthe, le troisième bras est ensuite ouvert et l'animal replacé dans le labyrinthe. La durée d'exploration et la fréquence d'entrées dans chacun des bras sont évaluées. Une souris avec des fonctions cognitives normales explore plus longuement le nouveau bras.

– Le labyrinthe de Barnes ou *Barnes Maze* est un test permettant d'évaluer la mémoire spatiale et d'apprentissage. Il consiste en une plateforme circulaire avec des trous tout autour de la périphérie. En dessous d'un des trous se trouve une boîte d'échappement. La souris est placée au centre de la plateforme, et un stress sonore ou lumineux est appliqué, poussant la souris à vouloir se cacher. Elle explore donc la table à la recherche d'une zone de refuge telle la boîte d'échappement. Le stress sonore est arrêté automatiquement une fois que l'animal retrouve la boîte d'échappement. Plusieurs sessions par jour sont répétées plusieurs jours successifs, afin d'évaluer les capacités d'apprentissage de l'animal. Après une phase de rétention, le test est ensuite renouvelé, en enlevant cette fois la boîte d'échappement et différents paramètres sont mesurés pendant les premières phases de test et après la rétention : la latence, la vitesse, le nombre d'erreurs, la distance parcourue... Une souris avec des fonctions cognitives normales commet moins d'erreurs grâce aux repères visuels placés dans la salle autour de la plateforme.

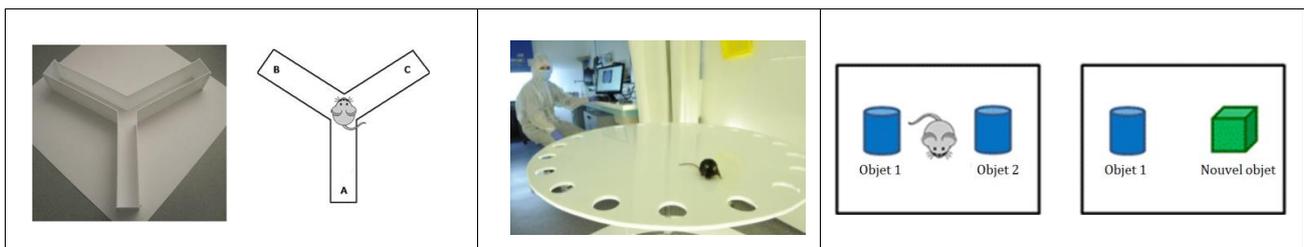


Figure 9: Tests comportementaux utilisés au laboratoire. Le labyrinthe en Y (à gauche), le labyrinthe de Barnes (au milieu), le test de reconnaissance d'un nouvel objet (à droite).

– Le test de reconnaissance d'un nouvel objet permet de mesurer la mémoire de reconnaissance visuelle. Les souris sont placées dans un champ exploratoire (*Open field*) contenant deux objets identiques, pendant une durée déterminée afin de laisser le temps à la souris de s'approcher et d'explorer les objets. Après une phase de rétention, l'un des objets est ensuite retiré et remplacé par un nouveau. Le temps d'exploration du nouvel objet est ensuite mesuré. Une souris avec des fonctions cognitives intactes explore plus longuement le nouvel objet [Leger *et al.* 2013].

Modèles	Gènes	Mutation	Promoteur	Plaques amyloïdes extracellulaires	Dépôts Aβ vasculaires	Neurites dystrophiques	DNFs	Perte neuronale/synaptique	Gliose	Troubles cognitifs/moteurs
APP23	APP	APP <sup>swe</sup>	Thy1	Oui (à 6 mois)	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui (à 3 mois)
Tg2576	APP	APP <sup>swe</sup>	Prion (hamster)	Oui (à 11 mois)	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui (à 5 mois)
PDAPP	APP	APP <sup>Ind</sup>	PDGF (humain)	Ouis (à 8 mois)	Non	Oui	Non	Oui	x	Oui
PS1(M146L)	PS1	M146L	PDGF (rat)	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	x
APP/PS1	APP, PS1	APP <sup>swe</sup> , PS1(L166P)	Thy1	Oui (à 1,5 mois)	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui (à 8 mois)
5xFAD	APP, PS1	APP <sup>(swe+Flor+Lon)</sup> , PS1(M146L/L286V)	Thy1 (APP), Thy1 (PS1)	Oui (à 2 mois)	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui (à 4-6 mois)
THY-Tau22	MAPT	G272V/ P301S	Thy1.2	Non	Non	Oui	Oui (à 3 mois)	Oui	Oui (modéré)	Oui (à 3 mois)
JNPL	MAPT	P301L	Prion (souris)	Non	Non	Oui	Oui (à 4,5 mois)	Oui	Oui	Oui (moteurs)
TAPP	APP, MAPT	APP <sup>swe</sup> , MAPT(P301L)	PrP (APP), PrP (MAPT)	Oui (à 6 mois)	x	Non	Oui (à 3 mois)	Non	x	Oui (moteurs)
3xTg	APP, PS1, MAPT	APP <sup>swe</sup> , MAPT(P301L), PS1 (souris M146V)	Thy1.2 (souris)	Oui (à 6 mois)	Non	x	Oui (à 12 mois)	Non	Oui	Oui (à 4 mois)

**Tableau 1:** Exemples de modèles animaux de la MA : modèles de la pathologie amyloïde (jaune), de la pathologie Tau (vert) et des deux pathologies (orange). APP : protéine précurseur amyloïde ; .MAPT : protéine tau associée aux licotubules ; PDGF : platelet derived growth factor ; PrP : protéine prion ; PS1 : préséniline 1 ; Thy1 : thymocyte, différenciation antigène 1. Mutations : APP<sup>swe</sup>= Suédoise (KM670/671NL) ; APP<sup>Flor</sup>= Floride (I716V) ; APP<sup>Ind</sup>= Indiana (V717F) ; APPLon= London V717L. [Schaeffer *et al.* 2011], [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)

## V. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES

Aucun traitement curatif ou préventif de la MA n'est disponible à ce jour. Néanmoins, diverses stratégies thérapeutiques sont actuellement utilisées, tandis que d'autres sont en cours d'investigation. Cette partie sera principalement consacrée aux approches d'immunothérapie, après une brève vue d'ensemble des autres traitements existants actuellement utilisés en clinique ou en cours d'évaluation.

### A. Les traitements actuels

Il existe actuellement deux sortes de traitements sur le marché : les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) et les antagonistes des NMDARs.

Les inhibiteurs de l'AChE ont été générés à la suite d'observations de la présence de lésions cholinergiques chez les patients MA et l'hypothèse cholinergique. Le principe de ces molécules est d'inhiber l'action de l'AChE afin d'augmenter la disponibilité de l'acétylcholine dans les fentes synaptiques et potentialiser la neurotransmission cholinergique altérée au cours de la MA. Il existe actuellement quatre inhibiteurs de la cholinestérase : le donezepil (majoritairement prescrit), la galantamine, la rivastigmine, et le tacrine. Ces traitements indiqués à tous les stades de la MA, améliorent les fonctions cognitives. Ces effets sont néanmoins modestes, réversibles et n'arrêtent pas la progression des troubles cognitifs chez le patient. Le tacrine est le premier traitement introduit sur le marché et est rarement prescrit à cause de sa forte toxicité hépatique.

La mémantine est un antagoniste partiel des NMDARs. Son mode d'action est de limiter la libération de glutamate excitotoxique et d'éviter la cascade d'évènements toxiques entraînant l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire aboutissant à la mort neuronale. Ce médicament est prescrit pour le traitement des patients MA, des stades modérés à sévères. L'effet bénéfique de la mémantine est controversé. Certaines études montrent une amélioration des fonctions cognitives [Doody *et al.* 2007] tandis que d'autres rapportent un effet moindre [Schneider *et al.* 2011]. Pour l'instant, la mémantine continue d'être prescrite chez les patients. De plus, une combinaison des traitements donezepil et mémantine semble augmenter l'effet bénéfique observé avec le traitement donezepil seul chez les patients de stades modérés à sévères [Tariot *et al.* 2004; Matsunaga *et al.* 2015].

Malgré leur effet bénéfique temporaire (inhibiteurs AChE) ou même controversé (mémantine) sur les fonctions cognitives, ces deux types de médicaments, seuls ou combinés,

continuent à être prescrits aux patients. Cela témoigne du manque de traitements réellement efficaces et montre à quel point les patients, les familles et les soignants sont dépourvus d'armes thérapeutiques face à la maladie.

## **B. Les autres stratégies thérapeutiques (hors immunothérapies)**

D'autres stratégies thérapeutiques ayant pour objectif d'améliorer les fonctions cognitives et d'agir sur certains mécanismes pathologiques de la MA sont actuellement en cours d'évaluation.

– Les inhibiteurs des sécrétases impliquées dans la voie amyloïdogène visent à réduire le clivage de l'APP et la production d'A $\beta$ . Ces enzymes étant impliquées dans l'hydrolyse d'autres protéines, leur inhibition complète pourrait entraîner des effets secondaires. C'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle l'essai clinique en phase III du semagacestat, a été arrêté. Ce dernier était le premier inhibiteur de  $\gamma$ -sécrétase à avoir été testé. Les patients traités avec le semagacestat ne présentaient aucune amélioration des fonctions cognitives, les patients présentaient en plus de sérieux effets secondaires : perte de poids, cancer de la peau et infections.

La molécule inhibitrice de  $\gamma$ -sécrétase devrait également avoir des propriétés biochimiques lui permettant de traverser la BHE et d'aller se fixer sur sa cible. Le verubecestat (MK-8931) est un inhibiteur des  $\beta$ -sécrétases BACE1 et BACE2 (homologue de BACE1) actuellement en phase 3 d'essai clinique. Les résultats préliminaires indiquent une réduction de 84 % du niveau d'A $\beta$  dans LCR des patients, les résultats finaux étant attendus en 2016 [Menting and Claassen 2014]. EVP-0962 est un modulateur de  $\gamma$ -sécrétase actuellement en phase 2. Le principe de cette molécule est de favoriser la production de formes courtes du peptide A $\beta$  (exemple A $\beta$ 38), aux dépens des formes longues telles que l'A $\beta$ 42 [Rogers *et al.* 2012].

– La réduction de la phosphorylation et de l'agrégation de la protéine Tau est une autre alternative thérapeutique. Plusieurs molécules inhibitrices de la GSK-3 $\beta$  ont été étudiées et n'ont montré aucun effet bénéfique. Le LMTX est un inhibiteur de l'agrégation de la protéine Tau actuellement en phase 3 d'essai clinique. Le principe actif du LMTX est le bleu de méthylène qui semble interférer avec l'interaction entre les protéines Tau [Wischik *et al.* 1996].

– Les récepteurs à ACh muscariniques et nicotiniques sont des récepteurs stimulés par l'ACh et également impliqués dans les mécanismes de mémoire et d'apprentissage. L'ABT-126 et l'Encenicline (EVP-6124) sont des agonistes de récepteurs nicotiniques respectivement en phase 2 et 3 d'essai clinique. Leur objectif est de booster la transmission cholinergique et améliorer les fonctions cognitives sans entraîner d'effets secondaires [Prickaerts *et al.* 2012].

De nombreuses autres stratégies thérapeutiques sont en cours d'étude. Les approches d'immunothérapie figurent parmi les plus avancées et les plus prometteuses.

### **C. Les immunotherapies anti A $\beta$**

Les études précliniques réalisées dans les modèles murins ont montré le potentiel de l'immunothérapie sur l'évolution de la maladie. Les travaux de Solomon et son équipe ont montré *in vitro* que les anticorps anti-A $\beta$  peuvent empêcher la formation de fibrilles [Solomon *et al.* 1996], dissocier les fibrilles déjà formées et inhiber leur toxicité [Solomon *et al.* 1997]. Ces observations ont conduit à l'émergence de thérapies basées sur l'immunothérapie active et passive.

Les anticorps, injectés ou produits de manière endogène par le système immunitaire de l'individu, pourraient entraîner la clairance des plaques selon plusieurs mécanismes. L'anticorps se fixe sur les peptides A $\beta$  solubles ou insolubles. La liaison de l'anticorps avec sa cible forme un complexe immun qui sera reconnu et phagocyté par les cellules microgliales via leurs récepteurs Fc (récepteurs présents à la surface des cellules et reconnaissant spécifiquement les fragments Fc de différentes classes d'immunoglobulines). Par neutralisation des peptides amyloïdes, les anticorps se lient aux peptides et l'ensemble forme un complexe immun, empêchant le peptide A $\beta$ , notamment dans sa forme soluble d'être toxique. Les anticorps peuvent également entraîner l'activation de la voie classique du complément ou agir depuis la périphérie, en neutralisant et captant le peptide A $\beta$  dans le sang et provoquant ainsi un efflux de peptide du LCR vers le sang [DeMattos *et al.* 2002; Lemere *et al.* 2003].

#### **1. Les immunothérapies actives et les leçons tirés de l'essai clinique AN1792**

En 1999, Schenk et ses collègues immunisent des souris transgéniques PDAPP avec le peptide A $\beta$ 42 en présence d'adjuvant complet de Freund (CFA). Cette immunisation active a entraîné une diminution de la pathologie amyloïde même chez les souris ayant reçu les

injections à un âge avancé après la formation des plaques [Schenk *et al.* 1999]. Les effets bénéfiques de l'immunothérapie sur l'amélioration des fonctions cognitives ont également été montrés [Janus *et al.* 2000;Morgan *et al.* 2000]. Ces résultats ont depuis été reproduits sans qu'aucune toxicité n'ait été rapportée.

Sur la base de ces observations encourageantes, le premier essai clinique d'immunisation anti-A $\beta$  chez l'homme (AN1792) a été mis en place. Il consistait en une administration d'A $\beta$ 42 synthétique en présence de l'adjuvant QS-21. La première phase de l'essai a été réalisée sur 80 patients du stade léger à modéré, qui ont reçu le vaccin complet AN1792 (A $\beta$ 42-QS21), l'adjuvant seul ou le placebo. Une production d'anticorps a été notée chez seulement 53% des patients, par conséquent, aux derniers stades de la phase I, un émulsifiant (polysorbate 80) a été ajouté à la formulation afin d'augmenter la solubilité du peptide et améliorer la stabilité du vaccin. Aucun effet indésirable notable n'a été rapporté à la fin de cette phase [Bayer *et al.* 2005]. La phase II de l'essai clinique a ensuite été initiée afin d'évaluer l'efficacité du traitement sur 372 patients. 300 patients ont reçu l'AN1792 et 72 autres le placebo. Seuls 20% des patients ayant reçu le traitement ont développé une réponse anticorps (répondeurs) au cours de cette phase II. L'essai clinique a été rapidement arrêté suite à la survenue de cas de méningoencéphalites, avec 6% (18/300) de cas au total [Orgogozo *et al.* 2003].

Les analyses neuropathologiques *post-mortem* des cerveaux de certains patients ayant développé une méningoencéphalite montrent une clairance efficace des dépôts amyloïdes dans différentes zones du cerveau, la pathologie Tau n'étant pas affectée [Nicoll *et al.* 2003;Masliah *et al.* 2005]. Ces observations sont similaires à celles obtenues dans les modèles précliniques, confirmant ainsi la validité de l'approche chez l'homme. En revanche, d'autres effets nettement plus préoccupants ont été observés dans certains cas : une altération de la substance blanche associée à une diminution de la densité des fibres myélinisées et une infiltration massive de macrophages [Nicoll *et al.* 2003], de multiples hémorragies corticales [Ferrer *et al.* 2004] et une forte augmentation des dépôts d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 dans les vaisseaux sanguins [Boche *et al.* 2008]. L'augmentation des dépôts amyloïdes cérébraux, caractéristiques d'une AAC sévère, malgré la diminution de la charge amyloïde dans le parenchyme cérébral, pourrait être expliquée par une solubilisation des plaques A $\beta$  par les anticorps produits après immunisation. Les peptides diffusent ensuite à travers les parois vasculaires et sont éliminés.

De façon intéressante, dans les zones dépourvues de plaques amyloïdes, des cellules microgliales réagissant avec les anticorps anti-A $\beta$  sont présentes, suggérant également une clairance des plaques par phagocytose.

La cause exacte de la méningoencéphalite dans cet essai clinique n'est pas connue, mais une infiltration massive de cellules T a été observée, dans les leptoméniges autour des vaisseaux, chez deux patients, suggérant le développement d'une réponse auto-immune T anti-A $\beta$  [Nicoll *et al.* 2003]. Le dosage des cytokines chez les patients répondeurs indiquent une augmentation des réponses IFN $\gamma$ <sup>+</sup> suggérant une réponse de type T helper 1 (Th1) proinflammatoire. De plus, une évolution d'une réponse de type Th2 anti-inflammatoire vers une réponse de type Th1 proinflammatoire après l'ajout du polysorbate a été suggérée [Pride *et al.* 2008].

Ces résultats pourraient être expliqués par la présence dans le vaccin du QS-21, un adjuvant connu pour promouvoir les réponses proinflammatoires de type Th1. L'utilisation du peptide A $\beta$ 42 entier contenant des épitopes détectables par les cellules B mais aussi les cellules T pourrait également être en cause. Les épitopes reconnus par les lymphocytes T sur le fragment A $\beta$  semblent en effet principalement localisés dans la région carboxyl-terminale (15-42), tandis que ceux ciblés par les lymphocytes B se trouvent près de la région N-terminale (1-14) [Monsonogo *et al.* 2003].

Malgré l'interruption de l'essai clinique, un suivi des patients qui n'ont pas développé de méningoencéphalite a été effectué afin d'évaluer l'effet à long terme du traitement sur l'évolution de la maladie. Un effet bénéfique du traitement sur les fonctions cognitives a été rapporté chez les patients ayant développé des réponses anticorps anti-A $\beta$ . Cependant cette étude a été menée uniquement sur une petite cohorte de 30 patients [Hock *et al.* 2003]. Une autre étude plus complète et plus tardive a montré que cet effet bénéfique serait très limité [Gilman *et al.* 2005] et au bout de six ans après le premier traitement, aucun signe de ralentissement du déclin cognitif n'est détecté, même chez les répondeurs [Holmes *et al.* 2008]. Cela suggère que l'élimination des plaques ne suffit pas à arrêter le processus dégénératif en cours, le faible effet bénéfique n'étant que transitoire.

Ces résultats sont à prendre avec précaution. L'essai clinique ayant été interrompu au début, tous les patients n'ont pas reçu le même nombre d'injection et n'ont donc pas pu développer une réponse anticorps optimale pour entraîner un effet thérapeutique.

A la suite de cet essai clinique, de grands efforts ont été fournis afin d'éviter de générer des réponses lymphocytaires T anti-A $\beta$  jugées délétères. De nombreuses approches

d'immunothérapie active de seconde génération ont été ainsi mises en place. Le principe de cette nouvelle génération d'immunothérapie active est d'utiliser des peptides ou des voies d'administration [Weiner *et al.* 2000], évitant de provoquer des réponses T délétères.

Différents groupes utilisent dans leur formulation le domaine N-terminale du peptide A $\beta$  contenant les épitopes des lymphocytes B et excluent ceux des cellules T de la région C-terminale. Le CAD106, en phase 2 d'essai clinique, est basé sur ce principe et combine plusieurs copies de l'A $\beta$ 1-6 issu de la région N-terminale couplées à un porteur.

Etant donné les difficultés à stimuler une réponse immunitaire chez les personnes âgées, ainsi que les questions de tolérance soulevées par l'immunisation active, l'utilisation d'une immunothérapie passive pourrait être une alternative thérapeutique plus judicieuse.

## **2. Les immunothérapies passives**

Elles consistent en une injection d'anticorps monoclonaux spécifiques du peptide A $\beta$ . Des études ont montré que des anticorps monoclonaux spécifiques de la région N-terminale du peptide A $\beta$ , après injection dans le sang de souris transgéniques, favorisent la phagocytose des plaques par les cellules microgliales [Bard *et al.* 2000a;DeMattos *et al.* 2001]. Ces observations suggèrent un rôle bénéfique d'une immunisation passive, en absence d'effet délétère majeur. Des anticorps spécifiques de la région N-terminale de l'A $\beta$  ont donc été générés pour une utilisation *in vivo* chez l'homme, et certains sont actuellement toujours en cours d'évaluation clinique.

Dans la gamme des immunothérapies passives, le Bapineuzumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant la partie N-terminale de l'A $\beta$  et reconnaissant les formes fibrillaires et solubles de l'A $\beta$ . Des œdèmes vasogéniques ont été observés après l'administration de la dose la plus élevée lors de la phase I. Malgré les données d'imagerie TEP montrant une réduction de la charge amyloïde, l'essai clinique a dû être arrêté en phase 3 car aucun effet clinique bénéfique n'a été montré [Salloway *et al.* 2014].

Le Solanezumab est un anticorps monoclonal humanisé capable de se fixer sur les formes solubles de l'A $\beta$ . Il est différent des autres anticorps par sa capacité à lier le domaine central du peptide, il serait plus efficace à éliminer les formes modifiées. Le Solanezumab a été évalué pour sa capacité à ralentir les troubles cognitifs sur des patients MA de stades léger à modéré. L'essai clinique arrivé en phase III a été arrêté car aucun effet bénéfique notable sur les fonctions cognitives des patients traités n'a été observé. Cependant l'analyse séparée des

deux sous populations, patients MA au stade léger et patients MA au stade modéré, montre une diminution du déclin cognitif uniquement au stade léger. Afin de confirmer ces résultats positifs, une seconde phase III est actuellement en cours, cette fois seulement sur des patients MA de stade léger [Siemers *et al.* 2015].

Le Gantenerumab est un anticorps monoclonal humanisé qui reconnaît les fibrilles d'A $\beta$  dans les dépôts amyloïdes du parenchyme et les dépôts vasculaires. Il cible les domaines centraux et N-terminaux du peptide A $\beta$ . L'évaluation clinique en phase III de cet anticorps a été arrêtée. Cependant, un effet bénéfique du Gantenerumab a été rapporté uniquement sur les patients MA en stade prodormal.

Une partie des résultats des essais cliniques du Solanezumab et du Gantenerumab montre un effet bénéfique potentiel de ces anticorps à des stades précoces de la maladie. Par conséquent, des essais cliniques (*Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)*), visant à tester ces anticorps à des stades très précoces (prodormal et léger) sont actuellement en cours.

L'Aducanumab, est un anticorps monoclonal dirigé contre des formes agrégées du peptide A $\beta$  dans le parenchyme. L'évaluation de cet anticorps est en cours chez des patients MA de stades prodormal à léger. L'anticorps montre un effet bénéfique sur la clairance des plaques et une diminution du déclin cognitif. L'évaluation clinique est actuellement en phase III. Si ces résultats prometteurs sont confirmés, cet anticorps sera le premier à avoir un effet bénéfique significatif sur l'évolution de la maladie.

### **3. Les immunothérapies anti-Tau**

L'immunothérapie A $\beta$  a montré que l'élimination des plaques n'a aucun effet sur la progression de la maladie ni sur les DNFs, dont la progression est corrélée à l'évolution de la maladie. Par conséquent le ciblage de la pathologie Tau semble être une stratégie alternative pertinente.

Des anticorps circulants anti-Tau et la forme phosphorylée de Tau ont été détectés dans le sérum de patients MA et des sujets âgés sains. Cela suggère une mise en place d'une réponse autoimmune naturelle anti-Tau, et un impact potentiel de ces anticorps sur la progression de la pathologie Tau [Rosenmann *et al.* 2006b]. Des approches d'immunothérapie ciblant Tau ont donc été testées dans des modèles murins. L'injection de la forme non phosphorylée de Tau a entraîné des lésions similaires à celles de la MA et une encéphalopathie, soulignant ainsi le potentiel neurotoxique de l'immunisation anti-Tau

[Rosenmann *et al.* 2006a]. En revanche, l'administration de formes phosphorylées de la protéine en présence de la toxine pertussique entraîne une diminution des DNFs chez les souris et ralentit la progression des déficits cognitifs. Aucun effet secondaire significatif n'a été observé [Asuni *et al.* 2007;Boimel *et al.* 2010].

Avec l'immunothérapie A $\beta$ , nous avons vu que le choix de l'épitope à cibler est très important pour induire une réponse sûre et efficace. La question se pose également en ce qui concerne la protéine Tau. La protéine dans sa forme non phosphorylée est impliquée dans diverses fonctions neuronales, seules ses formes pathologiques doivent donc être ciblées.

Plusieurs traitements ont été récemment lancés et sont actuellement en phase 1 d'essai clinique. L'AADvac-1 est un vaccin dont le but est de déclencher une réponse immunitaire contre les formes modifiées pathologiques de la protéine Tau. Le vaccin est constitué d'un court fragment d'acides aminés (résidus 294 à 305), issu du domaine de régulation de l'oligomérisation de la protéine Tau, d'une protéine porteur KLH et de l'hydroxyde d'aluminium (adjuvant). Ce vaccin est en cours d'évaluation chez des patients MA de stade léger à modéré. C'est le premier essai clinique d'immunothérapie active anti-Tau chez l'homme.

Le RG7345 est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le site de phosphorylation phospho-Ser422 sur la protéine tau phosphorylée, absent dans les conditions physiologiques [Troquier *et al.* 2012] et [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org).

## **VI. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE SNC**

### **A. Cerveau et immunité**

#### **1. Le Système Nerveux Central**

Le Système Nerveux Central (SNC) est formé de deux parties : la moelle épinière et l'encéphale. Ce dernier comprend le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet. Le SNC est organisé en différents compartiments : le parenchyme cérébral, les ventricules et les méninges. Les ventricules cérébraux sont des cavités contenant le LCR qui est produit par les plexus choroïdes. Le LCR diffuse des plexus choroïdes vers le reste du SNC, l'espace sous arachnoïde et se résorbe au niveau du bulbe olfactif et principalement au niveau des villosités arachnoïdes. Les méninges sont des membranes protégeant le cerveau et sont au nombre de trois. De l'extérieur vers l'intérieur le cerveau et la moelle épinière sont recouverts de la dure-

mère, la membrane arachnoïde et la pie-mère. Cette dernière est en contact direct avec le parenchyme cérébral (Figure 10).

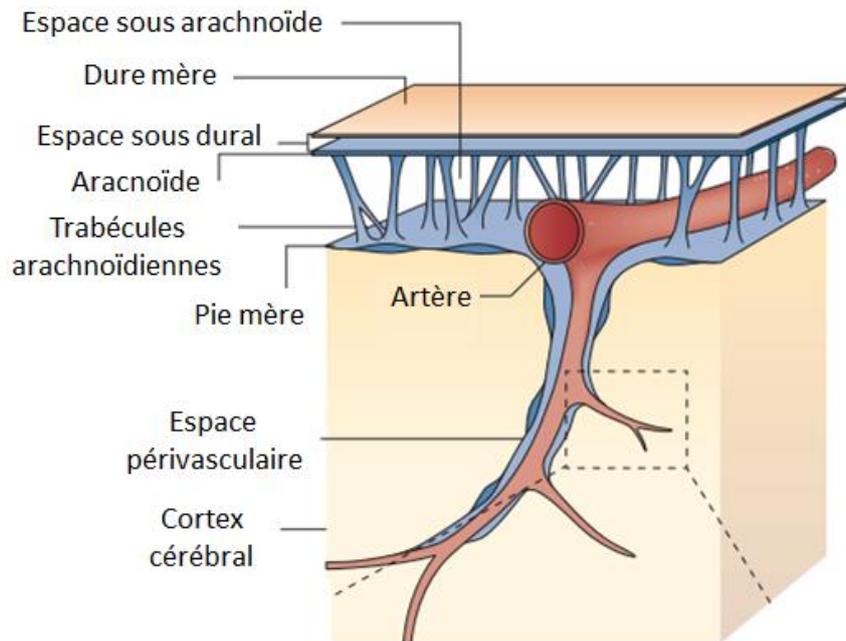


Figure 10: Schéma descriptif de l'organisation des méninges adapté de [Ransohoff and Engelhardt 2012a]

### a. Les Barrières

Trois barrières limitent et régulent les échanges moléculaires entre le sang et le tissu cérébral ou les fluides cérébraux.

- La barrière hémato encéphalique (BHE) : c'est une barrière physique entre le sang et le SNC. Elle est constituée de cellules endothéliales très spécialisées unies par des jonctions serrées complexes, sans fenestration, avec une faible activité de pinocytose. Le péricyte est incorporé dans une membrane basale vasculaire qui se connecte aux prolongements des pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins et formant la glia limitans (Figure 11).

La BHE contrôle le passage de substances du sang vers le SNC. De petites molécules comme le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), l'oxygène ( $\text{O}_2$ ), et autres petites molécules lipophiles peuvent diffuser librement à travers les membranes lipidiques. Elle constitue une interface régulatrice entre le SNC et le système immunitaire, fournit au cerveau les nutriments essentiels et médie l'efflux de nombreux déchets. La BHE restreint également les mouvements ioniques et celui des fluides entre le sang et le cerveau, permettant aux transporteurs ioniques spécifiques et canaux de réguler le trafic ionique. Cela permet la production du liquide

interstitiel du cerveau nécessaire au bon fonctionnement neuronal [Abbott *et al.* 2006]. Une altération de la BHE entraîne une infiltration des cellules du système immunitaire périphérique dans le cerveau et est caractéristique de la sclérose en plaques (SEP), une pathologie autoimmune.

- La barrière méningo-encéphalique (BME) sépare le LCR du cerveau et est constituée par les cellules épendymaires extrachoroïdiennes et la pie mère.
- La barrière hémato-méningée (BHM) sépare les vaisseaux sanguins du LCR. Elle est constituée de cellules épendymaires choroïdiennes de tissu conjonctif et de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. Au niveau des ventricules cérébraux, les capillaires sanguins forment des invaginations constituant les plexus choroïdes. L'endothélium vasculaire y est fenestré, ce qui permet des échanges entre le sang et le stroma des plexus choroïdes. Ce sont les seuls endroits où il peut y avoir un échange entre le LCR et le sang en passant par l'endothélium du plexus choroïde.

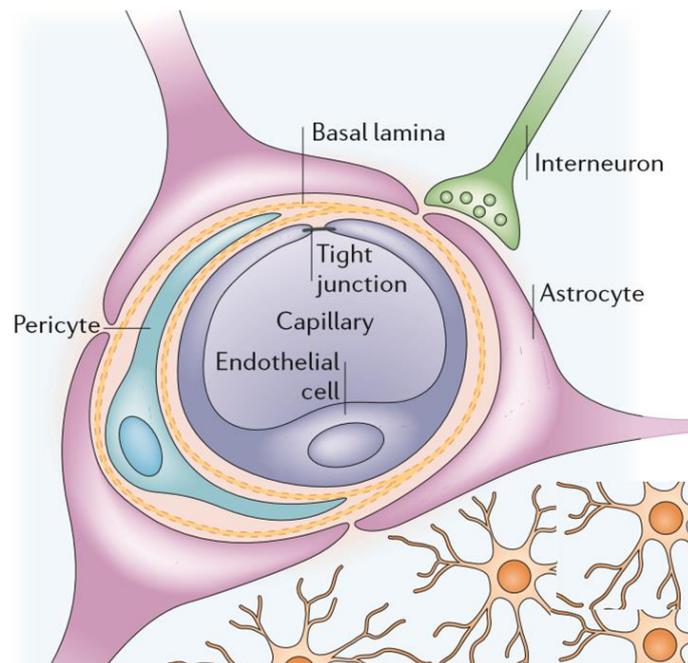


Figure 11: Les constituants cellulaires de la BHE [Abbott *et al.* 2006]

En plus de ces trois barrières, l'existence d'une quatrième a été suggérée par Bechmann et ses collègues : la barrière immuno-encéphalique (BIE ou IBB pour *immunological brain barrier*).

A la différence des autres, celle-ci n'est pas physique. Elle est caractérisée par une expression de FasL sur les neurones et les cellules microgliales autour des vaisseaux. Ces cellules entraîneraient l'apoptose de cellules exprimant la molécule Fas à leur surface et participeraient ainsi au maintien du statut immunitaire particulier du cerveau [Bechmann *et al.* 1999].

### **b. Les cellules immunitaires résidentes du SNC**

Le SNC est principalement composé de deux types de populations cellulaires : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales représentent une population hétérogène comprenant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et les cellules microgliales.

#### **– Les cellules microgliales ou macrophages résidents du SNC**

Les cellules microgliales ont été caractérisées pour la première fois par Santiago Ramon y Cajal en 1913 et par la suite par Pio Del Rio-Hortega en 1919. Les cellules microgliales constituent une population myéloïde distincte de celles retrouvées en périphérie. Elles sont issues de progéniteurs myéloïdes embryonnaires du sac vitellin qui colonisent le SNC au cours du développement [Ginhoux *et al.* 2010]. Ce sont les macrophages résidents du SNC où elles représentent environ 10% des cellules. En fonction de leur état d'activation, elles expriment à leur surface un grand nombre de molécules y compris les molécules du CMH de classe I et II, différents TLRs, l'intégrine CD11b, la glycoprotéine F4/80, le récepteur à chimiokine CX3CR1, des marqueurs intracellulaires tels que le CD68 et Iba1. En revanche par rapport aux macrophages et autres cellules hématopoïétiques d'origines périphériques, elles expriment plus faiblement le CD45. Les cellules microgliales sont généralement classées en trois types selon leur morphologie : une forme ramifiée « au repos », une forme activée, et une forme améboïde phagocytaire. [Ransohoff and Perry 2009;Ginhoux and Prinz 2015].

Les cellules microgliales très sensibles aux modifications de leur microenvironnement, assurent deux fonctions principales : le maintien de l'homéostasie du cerveau et la défense immunitaire. Dans les conditions physiologiques, les cellules microgliales assurent une fonction de surveillance du SNC. Elles sont très mobiles, elles patrouillent dans tout le cerveau, interagissent avec les autres cellules et scannent le microenvironnement local à la recherche de signaux de danger. Elles sont aussi impliquées dans la formation, la régulation et le maintien des synapses. Elles interagissent également avec les astrocytes, les neurones et oligodendrocytes pour maintenir l'intégrité des synapses et réguler l'activité neuronale. Par

conséquent elles jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et donc les mécanismes d'apprentissage et de mémoire [Salter and Beggs 2014]. Par ailleurs, les cellules microgliales nettoient les débris cellulaires et sont capables de s'activer rapidement quand elles détectent une modification de leur microenvironnement ou une intrusion pathologique. Elles modifient alors leur morphologie (forme améboïde). Elles augmentent leur expression des molécules telles que CD11b et Iba1, et en expriment d'autres associées à la présentation antigénique, qu'elles n'expriment pas à l'état naïf (CMH-II, CD80/CD86). Elles se multiplient pour assurer la défense du SNC par un mécanisme appelé microgliose et migrent directement vers le site de la lésion. Selon leur état d'activation (stimulis et réponses), les cellules microgliales sont souvent classées en cellules microgliales classiques M1 pro-inflammatoires ou alternatives activées M2 (M2a, M2b, M2c) anti-inflammatoires [Martinez and Gordon 2014].

Une forte concentration d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et/ ou le LPS favorisent une polarisation des cellules microgliales vers un profil M1 et entraînent la sécrétion d'IL-1, IL-6, IL-12, IL23 et d'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). La présence d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 favorise quant à elle leur polarisation vers un profil M2 produisant de l'IL-10, et de facteurs neurotrophiques tels que BDNF, IGF-1, NGF...

La classification des macrophages/ cellules microgliales selon leur profil d'activation est plus complexe qu'il n'y paraît [Murray *et al.* 2014]. Les macrophages ne constituent pas une population stable, mais répondent plutôt à une combinaison de facteurs présents dans leur microenvironnement. En plus de la composition en cytokines et/ou facteurs de croissance, d'autres éléments doivent être pris en compte : l'interaction des macrophages avec d'autres cellules du système immunitaires, la rencontre des macrophages avec les pathogènes... Tous ces éléments peuvent affecter le phénotype des macrophages. Jusqu'à présent, le profil M1/M2 a été utile pour distinguer les deux types de réponses principales pro- et anti-inflammatoire. Cependant les données actuelles de la littérature suggèrent que ces cellules peuvent adopter une grande variété de profils phénotypiques et fonctionnels. Une classification plus précise est requise afin de faciliter la compréhension de divers mécanismes dans lesquels ces cellules sont impliquées mais également de cibler de façon plus spécifique les sous populations d'intérêt.

Dans les conditions physiologiques et pathologiques, la fonction microgliale dépend fortement de l'ATP extracellulaire. Celui-ci est fourni par les astrocytes et se fixe sur les récepteurs purinergiques exprimés sur les cellules microgliales [Davalos *et al.* 2005]. Une activation appropriée pourrait contribuer à la préservation, la réparation et au renouvellement

tissulaire, tandis qu'une activation intense aiguë ou chronique peut entraîner des lésions irréversibles [London *et al.* 2013].

Les cellules microgliales sont impliquées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et peuvent avoir un rôle bénéfique ou délétère dans ces pathologies selon leur état d'activation [Nimmerjahn *et al.* 2005].

#### – **Les astrocytes**

Les astrocytes font partie de la macroglie avec les oligodendrocytes et les cellules épendymaires. Ils représentent environ 30% des cellules du SNC et sont localisés dans tout le parenchyme cérébral. Ils sont caractérisés par leur expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). D'autres molécules associées aux astrocytes ont été identifiées en fonction de leur localisation : transporteurs de glutamate GLT-1 (hippocampe et cortex cérébral) et GLAST (cervelet). Ce sont des cellules spécialisées qui participent à toutes les fonctions essentielles du cerveau, y compris la régulation de la circulation sanguine locale, l'intégrité de la BHE, le métabolisme énergétique, les défenses immunitaires, la neurotransmission et la neurogenèse. Leur morphologie et leur fonction dépendent de leur localisation cérébrale. Dans les conditions pathologiques, les astrocytes s'activent par un mécanisme appelé astrogliose. Ils s'hypertrophient, prolifèrent et modifient leur expression de certains gènes tels que celui de la GFAP. L'activation des astrocytes par des signaux inflammatoires entraîne l'expression d'autres molécules secondaires contribuant à une réponse immunitaire. Ainsi l'activation des astrocytes par le TNF $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  par exemple entraîne l'expression des chimiokines CXCL10 et CCL2. Le fait qu'ils puissent libérer et être la cible de facteurs inflammatoires, suggère un rôle potentiel de ces cellules dans le processus neuroinflammatoire au cours des pathologies neurodégénératives [Farina *et al.* 2007; Sofroniew and Vinters 2010].

#### – **Les autres phagocytes mononuclés du SNC**

D'autres phagocytes mononuclés sont présents dans le SNC et ont des phénotypes différents de celui des cellules microgliales. Les macrophages des plexus choroïdes expriment des marqueurs de cellules dendritiques (DCs) comme le CD11c et fonctionnent probablement comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA) dans les plexus choroïdes. Les macrophages méningés localisés dans l'espace sous arachnoïdien expriment des marqueurs caractéristiques des macrophages périphériques. Ils expriment fortement le CD45 et sont positifs pour l'expression des marqueurs CD11b et F4/80. Les macrophages périvasculaires sont retrouvés dans les espaces périvasculaires du parenchyme et au niveau des vaisseaux. Ils

expriment les molécules du CMH-II et peuvent restimuler les cellules TCD4<sup>+</sup> [Ransohoff and Engelhardt 2012c].

## 2. Le SNC, un organe « immunoprivilégié »

Une séparation anatomique du cerveau avec le reste du corps a été suggérée la première fois par les travaux de Paul Ehrlich au 19<sup>e</sup> siècle. Ce dernier a remarqué que des colorants intravitaux injectés dans la circulation sanguine, diffusent dans tous les organes sauf le cerveau. Ses observations ont été confirmées plus tard par Edwin Goldmann, qui a montré que des marqueurs injectés dans le LCR n'étaient pas détectés en périphérie. Dans la même période, des expériences de greffes de tissus hétérologues dans le SNC ont montré l'incapacité du système nerveux à déclencher une réponse immunitaire [Murphy and Sturm 1923]. Le SNC apparaît alors comme un site immunoprivilégié isolé du système immunitaire par la BHE.

C'est Peter Medawar, dans ses expériences de greffe de peau, qui a montré qu'une réponse immunitaire peut bien avoir lieu dans le SNC. Les greffes de peau dans le cerveau d'animaux naïfs n'induisent pas de réponse immunitaire. En revanche, si les animaux sont exposés en périphérie aux antigènes du greffon avant la greffe, les cellules du système immunitaire sont capables de rejeter le greffon au niveau cérébral au bout d'un certain temps. Ses résultats suggèrent une tolérance du SNC plus élevée que dans les organes périphériques et impliquent l'existence d'un système de drainage des antigènes [MEDAWAR 1948]. Des observations cliniques et précliniques ont montré que des réactions auto-immunes pouvaient également survenir dans le cerveau et que les cellules du système immunitaire inné et adaptatif ont accès aux différents compartiments du SNC (LCR, ventricules et parenchyme) dans des conditions physiologiques (immunosurveillance) et pathologiques.

Dès lors, l'immunoprivilège du SNC ne fait plus référence à un site totalement isolé, mais plutôt à un système hautement régulé. L'expression faible de molécules du CMH-I et II par les cellules du SNC (neurones et cellules microgliales), la production locale de facteurs immunosuppresseurs (TGFβ, IL10), le maintien des cellules microgliales dans un état « quiescent » par contact direct avec les neurones et les astrocytes, favorisent le maintien d'un environnement immunosuppresseur [Galea *et al.* 2007].

Cependant, la capacité à déclencher une réponse immunitaire dans le SNC est nécessaire pour contenir les infections et peut contribuer à la résolution des lésions tissulaires associées à de nombreuses affections cérébrales. Cette réaction immunitaire se développe dans le SNC

seulement si cela est indispensable. Elle a besoin d'être contrôlée car elle n'est pas toujours bénéfique. Le développement d'une pathologie associée à une méningite et/ou à une encéphalite peut être délétère pour la fonction et la survie neuronale. La neuroinflammation peut contribuer à la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives y compris la MA, la MP et la sclérose latérale amyotrophique (SLA).

### **3. La communication entre le SNC et le système immunitaire**

Les réactions immunitaires dans la plupart des tissus dépendent d'un drainage de l'antigène et la migration des CPAs le long des canaux lymphatiques vers les organes lymphoïdes secondaires dans lequel l'antigène est présenté aux cellules T et aux cellules B. Les cellules T naïfs ou mémoires et les cellules B activées quittent les organes lymphoïdes secondaires et recirculent dans l'ensemble de l'organisme. Ces éléments sont essentiels pour maintenir la tolérance immunitaire aux antigènes du soi et assurer l'immunosurveillance des différents organes de l'organisme. Malgré l'absence d'un système lymphatique conventionnel, il existe des systèmes de drainage efficaces du SNC vers les ganglions cervicaux et/ou le sang : le LCR et le fluide interstitiel.

Le LCR, produit par les plexus choroïdes, part des ventricules en passant par l'espace sous arachnoïde (localisé entre la pie-mère et la membrane arachnoïde) et est drainé dans le sinus veineux. Le LCR est également résorbé au niveau du bulbe olfactif à travers le plateau cribiforme de l'os ethmoïde, le long des nerfs olfactifs et se connecte au réseau lymphatique de la muqueuse nasale qui aboutit dans les ganglions cervicaux.

Le fluide interstitiel et les métabolites solubles sont drainés à travers le parenchyme cérébral et tout au long des membranes basales des parois périvasculaires des capillaires et des artères. Ils sont ensuite drainés vers les ganglions cervicaux. Cette voie de drainage ne laisse passer que des particules de petites tailles [Carare *et al.* 2008]. L'AAC est caractérisée par des dépôts amyloïdes dans les parois vasculaires du SNC. Des modèles d'AAC ont permis d'étudier cette voie de drainage du liquide interstitiel par un marquage de la distribution des dépôts amyloïdes tout au long des voies périvasculaires. Le fluide interstitiel et les molécules solubles sont également drainés à travers l'espace péri-vasculaire vers le LCR. A partir de là, les antigènes sont transportés vers les ganglions cervicaux via le réseau lymphatique de la muqueuse nasale.

Au sein de l'organisme, les vaisseaux lymphatiques représentent une seconde circulation, parallèle au réseau de vaisseaux sanguins. Ils drainent le liquide interstitiel vers les ganglions lymphatiques. Très récemment, l'équipe de Jonathan Kipnis a mis en évidence chez la souris

l'existence de vaisseaux lymphatiques méningés ayant les mêmes caractéristiques anatomiques et moléculaires que les autres vaisseaux lymphatiques (absence de cellules musculaires lisses et d'intégrine- $\alpha 9$ , expression du CCL21,...). De façon intéressante, ils ont démontré une connexion directe entre les méninges et les ganglions cervicaux et montré que ces vaisseaux lymphatiques constituent la principale voie de drainage du LCR vers les ganglions cervicaux (Figure 12). De plus, chez les souris naïves ces vaisseaux contiennent des cellules T, des cellules B, des cellules CMH-II<sup>+</sup> et des DCs [Louveau *et al.* 2015].

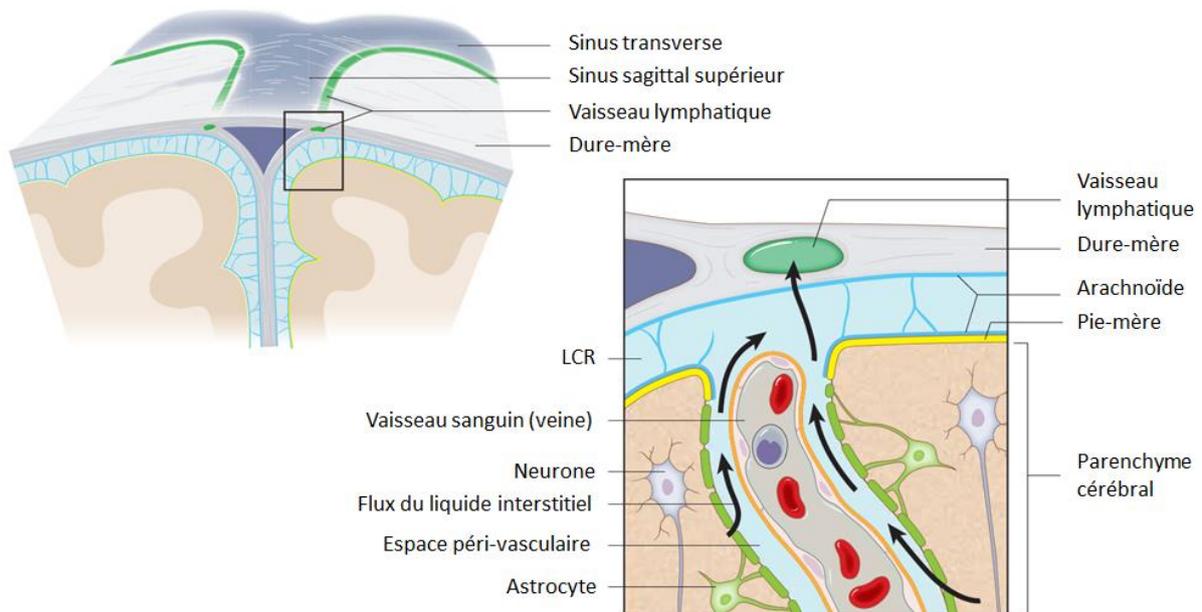


Figure 12: Le système lymphatique méningé et sa connexion avec le liquide interstitiel. Adapté de [Louveau *et al.* 2015]

Dans les conditions physiologiques, les cellules T sont présentes dans le LCR (environ 3000 cellules/ml) et pas dans le fluide interstitiel. Leur migration est contrôlée et est finement régulée par différents facteurs. Les cellules T constituent environ 90% des cellules présentes dans le LCR, avec une majorité de cellules TCD4<sup>+</sup> mémoires (CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) [Ransohoff and Engelhardt 2012b]. Une fois dans le LCR, les cellules jouent leur rôle d'immunosurveillance et scannent le microenvironnement à la recherche d'antigènes présentés par les CPAs.

## B. Les réponses immunitaires dans le SNC

### 1. Les réponses immunitaires innées

Les cellules microgliales sont les phagocytes résidents du SNC et y constituent la première ligne de défense contre les intrusions ou les lésions. Dans les conditions physiologiques, elles jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie neuronale. Une fois un signal de danger endogène ou exogène détecté, elles modifient leur activité et mettent en place une réponse immunitaire de type innée. Les signaux activateurs peuvent émaner de pathogènes, et être de type *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), ou provenir de modifications du microenvironnement local, telle qu'une dysfonction cellulaire et métabolique, ou une lésion. On parle alors de *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs). Les PAMPs et les DAMPs sont détectés par des familles de récepteurs les *Pattern Recognition Receptor* (PRR) présents à la surface ou à l'intérieur des cellules microgliales. Les PAMPs sont un ensemble de molécules microbiennes partageant un certain nombre de caractéristiques biochimiques (peptidoglycane, lipopolysaccharide, flagelline, ADN, parois cellulaires...) dont la présence signale l'intrusion d'un pathogène dans le CNS. Les DAMPs ou alarmines, englobent une classe de molécules très diversifiées comprenant des protéines endogènes, des acides nucléiques et des métabolites comme l'ATP, l'IL1 $\alpha$  et l'IL33 [Bianchi 2007]. Il existe plusieurs familles de PRRs, exprimées à la surface ou à l'intérieur des cellules microgliales : les *Toll-like receptors* (TLRs), les *Nod-like receptors* (NLRs), les *Rig-like receptors* (RLRs), les *Scavenger receptors* (SRs)... L'activation de ces PRRs par liaison aux PAMPs ou DAMPs déclenche l'activation cellulaire et une production de médiateurs inflammatoires [Gadani *et al.* 2015].

L'activité des cellules microgliales peut également être modifiée par l'absence de signal répresseur envoyé par les neurones à l'état basal. L'interaction entre des molécules exprimées à la surface des neurones et des cellules microgliales (CD200/CD200R, CX3CL1-CX3CR1, CD47-SIRP $\alpha$  (CD172)), maintient les cellules microgliales à l'état « quiescent ». Un processus de neurodégénération entraînant la destruction des neurones et la disparition de ce signal peut être un élément déclencheur de l'activation microgliale. Une altération de la BHE peut entraîner un œdème, une dérégulation de l'homéostasie ionique, et une infiltration cellulaire induisant une dérégulation neuronale. Elle représente donc également un signal de danger pour la cellule microgliale.

Dans les conditions pathologiques, les cellules microgliales peuvent avoir un effet bénéfique ou délétère selon leur profil d'activation. En fonction des signaux reçus, elles peuvent avoir un profil M1-like non phagocytaire, sécrétant du TNF $\alpha$ , l'IL1, l'IL6, l'IL12 et l'IL23, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO), ou un profil M2-like phagocytaire, sécrétant des facteurs neurotrophiques tels que l'IGF1, du BDNF, du TGF $\beta$ , ainsi que des cytokines telles que l'IL3, l'IL4 et l'IL10.

Le rôle bénéfique des cellules microgliales peut se manifester par : une activité phagocytaire entraînant la clairance des dépôts protéiques pathologiques et des agents pathogènes, la régulation de la plasticité synaptique par la libération de BDNF, et la régulation de la neurogénèse [Kettenmann *et al.* 2011].

Une des caractéristiques des maladies neurodégénératives est l'activation chronique des cellules microgliales favorisant leur différenciation vers un profil de type neurotoxique. Le rôle des cellules microgliales au cours d'évènements pathologiques tels que la sclérose en plaque a été mis en évidence par des expériences d'induction de l'EAE (Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale) dans des souris CD11b-HSV-TK qui expriment le gène suicide de la thymidine kinase du virus de l'*herpes simplex*, restreinte aux cellules myéloïdes. L'administration de gancyclovir chez ces souris élimine de façon spécifique les cellules CD11b<sup>+</sup>. Dans ce modèle, l'inhibition de l'activité microgliale entraîne une amélioration des signes cliniques de l'EAE, indiquant le rôle délétère joué par ces cellules dans la sévérité de l'EAE [Heppner *et al.* 2005].

Après leur activation, les cellules microgliales sécrètent une grande quantité de chimiokines telles que le CCL2, le CCL3, le CCL4, CCL5 et le CXCL2. Le CCL2 est un chemoattractant favorisant le recrutement de leucocytes et de macrophages dérivés des monocytes exprimant à leur surface le CCR2. Cette forte production de cytokines et l'activation des cellules endothéliales et des astrocytes peuvent fragiliser la BHE et activer les cellules endothéliales. L'activation de ces dernières induit également la production de CCL2, le CCL5 et de CXCL10. Cela entraîne une infiltration de cellules immunitaires périphériques telles que les macrophages CCR2<sup>+</sup> dans le SNC. Une fois dans le cerveau, la distinction entre les macrophages et les cellules microgliales est difficile. Elles sont généralement différenciées par leur niveau d'expression du marqueur CD45 (forte pour les macrophages et faible pour les cellules microgliales). Pendant très longtemps, aucun marqueur spécifique n'a permis de différencier de façon catégorique les deux populations cellulaires. Cependant, la génération de souris CCr2<sup>RFP</sup>Cx3cr1<sup>GFP</sup> permet de traquer les cellules microgliales (GFP<sup>+</sup>) et les monocytes

(RFP<sup>+</sup>) dans le cerveau [Saederup *et al.* 2010] et d'autres travaux ont identifié une série de gènes qu'ils considèrent comme étant une signature génique particulière des cellules microgliales [Butovsky *et al.* 2014a].

Plusieurs études ont montré le rôle bénéfique des macrophages infiltrant. La surexpression d'IL1 $\beta$  dans le cerveau de souris APP-PS1 entraîne une augmentation de CCL2 dans le cerveau, associée à une microgliose et une atténuation du phénotype pathologique chez ces souris [Lee *et al.* 2010]. De même, des études dans un modèle de souris MA déficientes en CCR2 montrent une diminution drastique de nombre de cellules accumulées dans le parenchyme et autour des plaques, et une aggravation de la maladie [El *et al.* 2007]. Il a également été montré que des macrophages de type «M2» à activité anti-inflammatoire sont recrutés dans le SNC à la suite d'une lésion de la moelle épinière [Shechter *et al.* 2013]. L'ensemble de ces résultats montre que les cellules microgliales et les macrophages recrutés depuis la périphérie peuvent avoir un rôle bénéfique dans les pathologies du SNC [El and Luster 2008]. Néanmoins, le rôle des macrophages infiltrant par rapport aux cellules microgliales reste sujet à de nombreuses controverses, du fait de l'absence de marqueur spécifique permettant de le distinguer.

Une fonction essentielle de l'immunité innée est d'apporter l'information à l'immunité adaptative. Dans les organes périphériques, les DCs détectent la présence et la nature des agents pathogènes (infections virales, bactériennes, ou protozoaires ; intracellulaires ou extracellulaires). Les antigènes sont apprêtés et présentés à leur surface sur les molécules du CMH-I ou II. Ensuite, ces cellules migrent vers les ganglions drainants afin de présenter l'antigène aux cellules T naïves ou mémoires. Dans les conditions physiologiques, les DCs exprimant les molécules du CMH-II sont présentes dans les vaisseaux lymphatiques méningés [Louveau *et al.* 2015], dans les vaisseaux des plexus choroïdes [Prodinge *et al.* 2011], dans les espaces périvasculaires et dans le LCR. Elles ne sont détectées dans le parenchyme cérébral qu'au cours d'un processus inflammatoire après altération de la BHE, y compris dans des contextes de maladies neurodégénératives.

En complément de leur rôle de médiateurs des réponses innées, les cellules microgliales participent également à l'initiation des réponses adaptatives. L'activation des cellules microgliales induit en effet une augmentation de l'expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) à leur surface.

## 2. Les réponses immunitaires adaptatives

Les cellules T et B reconnaissent les antigènes par leur récepteur spécifique, respectivement le TCR (récepteur de cellules T) et le BCR (récepteur de cellules B). La diversité des TCRs et des BCRs permet de reconnaître une très grande variété d'antigènes. Les lymphocytes B (LB) peuvent reconnaître directement des antigènes natifs, tandis que les lymphocytes T (LT) reconnaissent des antigènes apprêtés, présentés par des molécules du CMH exprimées à la surface des CPAs. En périphérie, il existe trois types d'APCs professionnelles bien caractérisées qui ont seules la capacité d'activer des réponses lymphocytaires : les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques. Dans le cerveau, dans un contexte inflammatoire, les cellules microgliales expriment les molécules du CMH de classe II et les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86), leur permettant ainsi potentiellement de présenter des antigènes. Les astrocytes expriment plus rarement les molécules du CMH de classe II, et peuvent donc potentiellement également présenter des antigènes.

Les cellules T constituent une grande population très diversifiée, divisée en deux grands groupes : les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (LT CD8<sup>+</sup>), reconnaissant les épitopes (8-10 aa) présentés par des molécules du CMH de classe I et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) reconnaissant les épitopes (12-25 aa) présentés par les molécules du CMH de classe II. Les LT CD4<sup>+</sup> jouent un rôle clé dans le fonctionnement du système immunitaire. Ils assistent les LB dans la production d'anticorps (coopération cellulaire), ils favorisent et maintiennent les réponses des LT CD8<sup>+</sup>, ils modulent l'activation et la fonction des macrophages, orchestrent les réponses immunitaires dirigées contre un grand nombre d'agents pathogènes et régulent l'intensité des réponses immunitaires afin de contrôler l'autoimmunité. La suite du manuscrit sera principalement consacrée à l'analyse des réponses T CD4<sup>+</sup>.

Les LT CD4<sup>+</sup> forment le groupe le plus diversifié, comprenant notamment les cellules T conventionnelles, dites auxiliaires ou T *helper* (Th) de type Th1, Th2 et Th17, et les cellules T régulatrices (Tregs). Ces différentes cellules ont des fonctions effectrices et des profils de sécrétion de cytokines différents. De plus, l'environnement cytokinique joue un rôle critique dans la différenciation fonctionnelle des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en différents types de cellules T effectrices activées (Figure 13).

En présence d'IL-12, les LT CD4<sup>+</sup> naïfs stimulés en présence de leur antigène présenté par les cellules dendritiques se différencient en Th1 produisant de l'IFN $\gamma$ . Le phénotype inflammatoire Th1 est contrôlé par le facteur de transcription Tbet et joue un rôle dans

l'élimination des pathogènes intracellulaires. La différenciation des cellules Th17 (associées à une fonction pro-inflammatoire) est contrôlée par le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et est induite en présence d'IL-23 et d'IL-6 et de faibles concentrations de TGF $\beta$ . Ils jouent un rôle dans l'immunité des muqueuses en produisant notamment de l'IL-17 et de l'IL-22. Les Th1 et Th17 sont également impliqués dans les réponses neuroinflammatoires et sont associés à des lésions neuronales, comme dans la sclérose en plaques.

Les Th2 se caractérisent entre autre par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, et sont contrôlés par le facteur de transcription Gata3. Ces cellules jouent un rôle dans l'allergie et la défense contre les parasites (helminthes).

Les Tregs sont caractérisés par leur forte expression du marqueur CD25 (chaîne  $\alpha$  de haute affinité du récepteur à l'IL2) et le facteur de transcription Foxp3, qui contrôle leur différenciation fonctionnelle. Ils produisent notamment de l'IL-10, du TGF $\beta$  et de l'IL-35. Les Tregs modulent l'intensité des réponses des LT effecteurs et jouent un rôle critique dans le maintien de la tolérance. Leur fonction et leur implication dans la MA seront discutées dans une partie ultérieure de ce manuscrit.

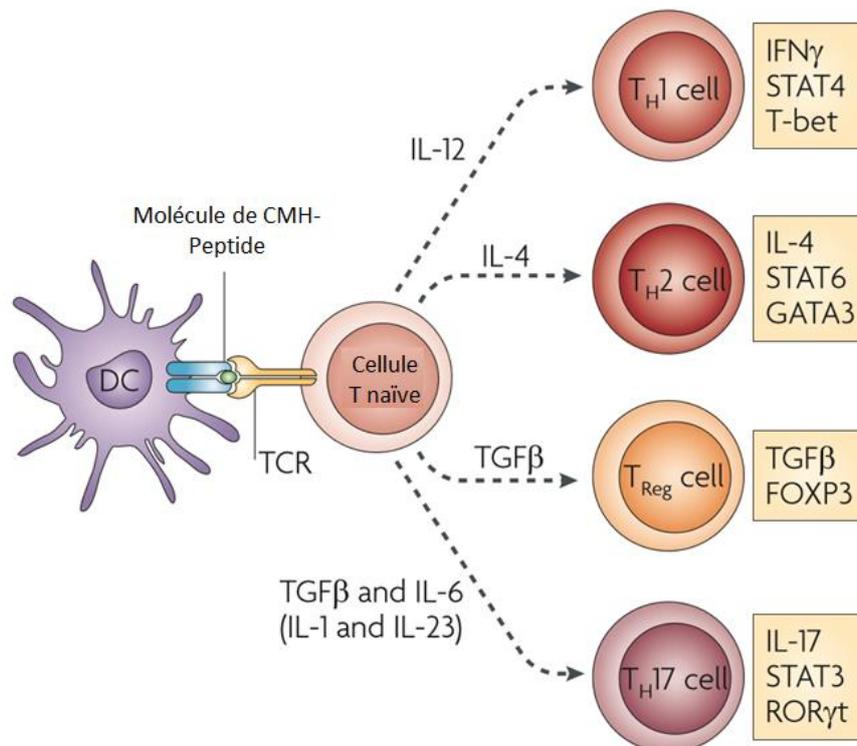


Figure 13: Les sous populations de cellules T CD4<sup>+</sup> [Zou and Restifo 2010]

Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves sont stimulées dans les ganglions cervicaux par les DCs résidentes ayant captés les antigènes drainés par le LCR et le fluide interstitiel, ou

potentiellement par les DCs drainés dans le LCR [Karman *et al.* 2004;Hatterer *et al.* 2008]. De plus, dans le cas d'un pathogène neurotrope, une réponse périphérique est d'abord initiée dans les ganglions périphériques avant la migration des cellules vers le SNC. Il a également été montré qu'une fraction importante des cellules TCD4<sup>+</sup> mémoires spécifiques d'antigènes du SNC résident dans les plexus choroïdes [Baruch *et al.* 2013b]. Leur réactivation peut se faire localement par les DCs résidentes.

Une fois activés, les LT CD4<sup>+</sup> augmentent leur expression de molécules d'adhérence comme la PSGL-1 (glycoprotéine ligand de la P-selectine), le LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen*) et des récepteurs de chimiokines (CCR7, CXCR3). Ils migrent ensuite vers le site de la lésion ou de l'infection. Le passage à travers la BHE se fait par des mécanismes de roulement le long des vaisseaux méningés, et d'adhésion aux parois vasculaires. Le passage à travers l'endothélium se fait par extravasation grâce aux intégrines exprimées par les cellules T. Les cellules endothéliales des vaisseaux méningés expriment également des ligands aux molécules d'adhésion (P-selectine), des intégrines (intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*)) et des chimiokines (CCL19 et CCL21) [Engelhardt and Ransohoff 2012]. Les cellules se retrouvent dans l'espace périvasculaire et l'entrée dans le parenchyme nécessite de traverser la glia limitans. Ce processus est régulé par les métalloprotéases de matrice (MMP2 et MMP9) [Agrawal *et al.* 2006].

Les cellules T CD4<sup>+</sup> interagissent avec les CPAs, notamment les APCs périvasculaires qui leur présentent une nouvelle fois l'antigène, permettant ainsi leur passage dans le parenchyme. A l'image des cellules microgliales, les cellules T peuvent avoir une action délétère ou bénéfique. Ces effets dépendent de l'environnement dans lequel elles se trouvent et notamment les APCs qui régulent leurs réponses.

L'intervention des cellules T dans les pathologies cérébrales est souvent associée à une action délétère. Leur infiltration dans le cerveau a une influence critique sur le profil d'activation des cellules microgliales. La SEP est l'une des maladies dans laquelle les réponses T dans le cerveau ont été largement étudiées. Elle est caractérisée par une destruction de la myéline médiée par les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs. Les études dans les modèles EAE ont montré que les cellules Th1 et surtout les cellules Th17 infiltrent le cerveau et la moelle épinière après lésion de la BHE et avant l'apparition des signes cliniques, et jouent un rôle central dans la pathogenèse et la progression de la maladie. Leur infiltration dans le parenchyme cérébral est suivie de l'activation des cellules microgliales et de la production

d'IL1 $\beta$ , de TNF $\alpha$  et d'IL6 favorisant une inflammation, une altération de la BHE, une infiltration d'autres cellules T et de macrophages activés dans le parenchyme [Murphy *et al.* 2010].

Cependant de plus en plus de données indiquent que certaines sous populations de cellules T, notamment les Th2 et les Tregs, jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du SNC et sur les fonctions cognitives à l'état basal, mais aussi dans un contexte pathologique. Plusieurs travaux ont montré que les LTCD4<sup>+</sup> sont nécessaires au maintien des fonctions cognitives en se différenciant en cellules Th2 anti-inflammatoires et en produisant de l'IL-4 et de l'IGF1 [Kipnis *et al.* 2012] ou en favorisant une polarisation des cellules myéloïdes vers un profil de type « M2 » [Derecki *et al.* 2011]. Une étude récente a montré que cet effet neuroprotecteur peut avoir lieu indépendamment de la reconnaissance antigénique. Les cellules TCD4<sup>+</sup> répondent à des médiateurs solubles (DAMPs) produits par les neurones lésés et produisent de l'IL-4. Ce dernier va se fixer sur son récepteur à la surface des neurones, déclenchant ainsi la production de neurotrophines et de facteurs de croissance (BDNF, NGF, IGF1) [Walsh *et al.* 2015]. Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont également impliquées dans les mécanismes de survie neuronale. Plusieurs travaux ont montré l'effet bénéfique de ces cellules à la suite de lésions du motoneurone. Des souris déficientes en cellules T et B voient la survie de leur motoneurones réduite. Une reconstitution de ces mêmes souris avec des splénocytes totaux permet de restaurer la réparation de la lésion [Serpe *et al.* 2000; Serpe *et al.* 2003].

Le transfert adoptif de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes du SNC améliore les fonctions cognitives [Radjavi *et al.* 2014] et prévient la dégénérescence des neurones proches des sites de lésion [Moalem *et al.* 1999; Hauben *et al.* 2000]. Cela souligne le rôle bénéfique des T autoréactifs dans l'immunosurveillance et après les lésions du SNC. De là est né le concept d'« autoimmunité protectrice », principalement développé par l'équipe de Michal Schwartz et celle de Jonathan Kipnis. Selon cette théorie, les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> reconnaissant les antigènes du soi du SNC participent à la protection, la réparation, l'homéostasie tissulaires et le maintien de la plasticité neuronale, dans un contexte physiologique, mais également pathologique [Schwartz and Baruch 2014]. Cette « autoimmunité protectrice » passerait par le recrutement de cellules myéloïdes périphériques anti-inflammatoires (production d'IL-10) par les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigène du SNC [Shechter *et al.* 2009]. Dans un contexte physiologique, les cellules T sont localisées dans le LCR, dans les méninges, mais aussi dans les plexus choroïdes. Michal Schwartz et son

équipe ont montré que les plexus choroïdes sont une voie d'entrée dans le SNC de ces cellules T et myéloïdes de profil anti-inflammatoires. Ils ont également montré que les plexus choroïdes sont enrichis en lymphocytes TCD4<sup>+</sup> mémoires spécifiques d'antigènes du SNC [Baruch *et al.* 2013a]. Ces cellules produisent de l'IL4 et de l'IFN $\gamma$ , suggérant la présence de cellules T de type Th1 et Th2. De plus, ce trafic des cellules à travers l'épithélium des plexus choroïdes vers le parenchyme cérébral serait étroitement régulé par la signalisation de l'IFN $\gamma$  [Kunis *et al.* 2013].

Les cellules T régulatrices jouent un rôle important dans le control des réponses immunitaires notamment les réponses autoimmunes. Par conséquent, dans un contexte d'« autoimmunité protectrice », les Tregs pourraient avoir un rôle délétère. Cependant, les réponses immunitaires dans le SNC sont très complexes. L'élimination des Tregs, dans le but de favoriser une réponse autoimmune protectrice est très risquée. Une réponse incontrôlée des cellules T autoréactives pourrait rapidement devenir délétère et causer des lésions très graves du SNC. Il est donc important de pouvoir moduler les réponses Tregs, tout en permettant une mise en place d'une réponse autoimmune potentiellement bénéfique.

### **3. Immunosenescence et SNC**

Le vieillissement est une altération fonctionnelle progressive qui affecte tous les organes. Le système immunitaire est également affecté, la compétence immunitaire décline avec l'âge, augmentant la morbidité et la mortalité à cause de certaines infections.

Une des raisons principales de la diminution des réponses immunitaires observée avec l'âge est la réduction importante du nombre de lymphocytes T naïfs et une augmentation de cellules T mémoires avec un répertoire moins diversifié. Ceci est une conséquence de la prolifération homéostatique compensatoire en réponse à la réduction du nombre de cellules naïves et l'influence de l'exposition chronique à des agents pathogènes et d'antigènes de l'environnement [Pinchuk and Filipov 2008]. Cette diminution de la capacité à répondre face à de nouveaux antigènes ainsi qu'une stimulation chronique des cellules T mémoires expliquent en grande partie la susceptibilité des personnes âgées à développer des infections et des maladies. De plus le vieillissement peut altérer les mécanismes de tolérance et augmenter ainsi le risque de développer des maladies autoimmunes. Une fréquence élevée de Tregs a été observée chez les sujets âgés [Rosenkranz *et al.* 2007a].

Les cellules du système immunitaire inné sont également affectées, leur nombre et leur fonctionnalité sont modifiés par le vieillissement. Les cellules NK augmentent en nombre

mais leur cytotoxicité diminue, l'activité phagocytaire des macrophages diminue également [Panda *et al.* 2009].

L'immunosénescence s'accompagne d'une inflammation non spécifique chronique à bas bruit [Franceschi *et al.* 2000] et contribue au développement de maladies associées au vieillissement.

Les cellules microgliales sont également affectées par le vieillissement. Elles subissent un changement morphologique [Streit *et al.* 2004], phénotypique, et fonctionnel progressif au cours du vieillissement. Leur motilité et leur activité phagocytaire est réduite avec l'âge. Cet état est corrélé avec une augmentation de la production de facteurs proinflammatoires, une élévation du niveau d'expression de molécules du CMH de classe II et de molécules d'activation [Deleidi *et al.* 2015]. Cela pourrait entraîner une altération de la BHE et une infiltration du SNC par des cellules immunitaires d'origine périphérique. Ces altérations favorisent l'apparition des maladies neurodégénératives telles que la MA.

De plus, le vieillissement affecte le système circulatoire périphérique (augmentation des cytokines et de chimiokines proinflammatoires). Compte tenu de l'altération progressive de la BHE avec l'âge [Montagne *et al.* 2015], cette inflammation systémique peut avoir une influence négative sur les fonctions cognitives et la neurogénèse chez la souris [Villeda *et al.* 2011].

#### **4. Inflammation systémique et neuroinflammation**

L'inflammation systémique est caractérisée par une production de cytokines proinflammatoires, telles le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$  et IL6, dans le compartiment périphérique. Des études chez des personnes âgées ont montré qu'une faible inflammation systémique chronique est associée à un déclin cognitif. De plus, des études rétrospectives ont montré que la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par certains patients MA et MP retarde l'apparition de la maladie et diminue sa sévérité. Cependant l'effet des AINS diffère d'une étude à l'autre, et leur évaluation clinique sur la progression de la MA n'a pas montré d'effet bénéfique significatif. Ces observations suggèrent quand même que les réponses immunitaires en périphérie pourraient avoir un effet sur des mécanismes contrôlant les fonctions cognitives.

Une augmentation de TNF $\alpha$  [Holmes *et al.* 2009] et d'IL6 [Holmes *et al.* 2011] dans le sérum de patients MA a été associée à une augmentation des troubles cognitifs.

### C. Implication du système immunitaire dans les maladies neurodégénératives

Les caractéristiques pathologiques les plus communément décrites des maladies neurodégénératives concernent souvent un mauvais repliement et une agrégation de protéines, des dysfonctions mitochondriales, une altération du métabolisme des lipides, des protéines et des acides nucléiques, l'excitotoxicité... Malgré de longues années de recherches, ces maladies neurodégénératives demeurent toujours mal comprises, ce qui limite le développement de traitements. De nombreuses études ont montré que le système immunitaire est associé à un grand nombre de ces pathologies.

La MA, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique sont des maladies neurodégénératives caractérisées par une protéinopathie. Nous avons vu que les deux principales caractéristiques de la MA sont des dépôts amyloïdes extracellulaires et des agrégats intracellulaires de la protéine Tau hyperphosphorylée. Plusieurs données expérimentales et génétiques ont révélé le rôle important de l'activation du système immunitaire inné dans la pathogenèse de la MA [Lambert *et al.* 2009; Lambert *et al.* 2010; Jonsson *et al.* 2013; Lambert *et al.* 2013b]. L'implication du système immunitaire dans cette pathologie sera largement étudiée dans les prochains chapitres.

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par une mort lente et progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire et l'accumulation et la formation d'agrégats de la protéine  $\alpha$ -synucléine et de l'ubiquitine dans des inclusions cytoplasmiques appelées corps de Lewy. Ces inclusions cytoplasmiques sont retrouvées aussi bien dans les formes familiales que dans les formes sporadiques. L'étiologie de la maladie n'est pas bien connue. Cependant, la découverte du 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), une molécule causant un syndrome parkinsonien, suggère l'implication de toxines présentes dans l'environnement cérébral. Cette molécule est largement utilisée aujourd'hui pour étudier la maladie dans de nombreux modèles murins. Certaines données suggèrent que la mort apoptotique des neurones serait médiée par des mécanismes inflammatoires impliquant les cellules microgliales. Des études *post-mortem* ont révélé la présence de cellules microgliales activées, de cellules T et de cytokines dans le cerveau de patients MP. Cela suggère une implication du système immunitaire dans la physiopathologie de cette maladie [Hirsch and Hunot 2009].

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Lou Gehrig, est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones dans le SNC, entraînant progressivement une faiblesse et une atrophie musculaires entraînant à terme une paralysie fatale [Boillee *et al.*

2006]. L'étiologie de la SLA reste inconnue. Cependant environ 10% des cas sont des formes héréditaires et impliquent des mutations dans certains gènes dont les plus importantes sont localisées dans le gène codant pour une enzyme intracellulaire la superoxyde dismutase 1 (SOD1), qui forme des agrégats protéiques dans le parenchyme. Les mécanismes impliqués dans la maladie sont multiples : neuroinflammation, stress oxydatif, excitotoxicité du glutamate, altération du métabolisme mitochondrial... Les modèles d'étude de la maladie sont basés sur des mutations dans le gène de la SOD1.

La neuroinflammation occupe une place importante dans la SLA. La présence de cellules microgliales, de cellules T et d'astrocytes activés, à proximité des lésions neuronales a également été décrite dans le cerveau de patients SLA et dans les modèles animaux [Philips and Robberecht 2011].

## **VII. LES REPONSES IMMUNITAIRES AU COURS DE LA MA**

### **A. Les réponses innées au cours de la MA**

Les cellules microgliales jouent un rôle important dans la progression de la MA en éliminant les plaques amyloïdes par phagocytose et en libérant des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, ROS). Les dépôts amyloïdes ainsi que les formes solubles de l'A $\beta$  peuvent stimuler l'activité des cellules microgliales par le biais de PRRs exprimés à la surface des cellules. Plusieurs récepteurs impliqués dans la liaison avec les peptides amyloïdes ont été décrits : le TLR2 [Liu *et al.* 2012], TLR4, TLR6, TLR9, des corécepteurs CD36, CD14 et CD47, et hétéromère TLR4/TLR6 [Stewart *et al.* 2010]. Les récepteurs de type Scavenger et RAGEs peuvent également fixer les peptides A $\beta$ . Les cellules microgliales ont la capacité de phagocyter les peptides amyloïdes après leur fixation à certains récepteurs (TLR4, TLR2, CD36, CR1...). Les formes solubles peuvent également être dégradées par des protéases extracellulaires, IDE et neprilysine, libérées par les cellules microgliales. Un autre des mécanismes par lequel le peptide A $\beta$  peut provoquer une réponse inflammatoire est l'activation de l'inflammasome.

La phagocytose du peptide A $\beta$  par les cellules microgliales peut entraîner des lésions du lysosome. Cette déstabilisation peut activer le récepteur intracellulaire NLRP3 appartenant à la famille des NLRs et favoriser l'assemblage des différents éléments de l'inflammasome (Figure 14). Cela entraîne une activation de la voie des caspases et une sécrétion massive

d'IL1 $\beta$  et d'IL18 [Heneka *et al.* 2013a;Gold and El 2015]. Récemment, il a été montré que l'inhibition de NLRP3 augmente l'activité phagocytaire des cellules microgliales et favorise leur différenciation fonctionnelle vers un profil de type « M2 » anti-inflammatoire [Heneka *et al.* 2013b].

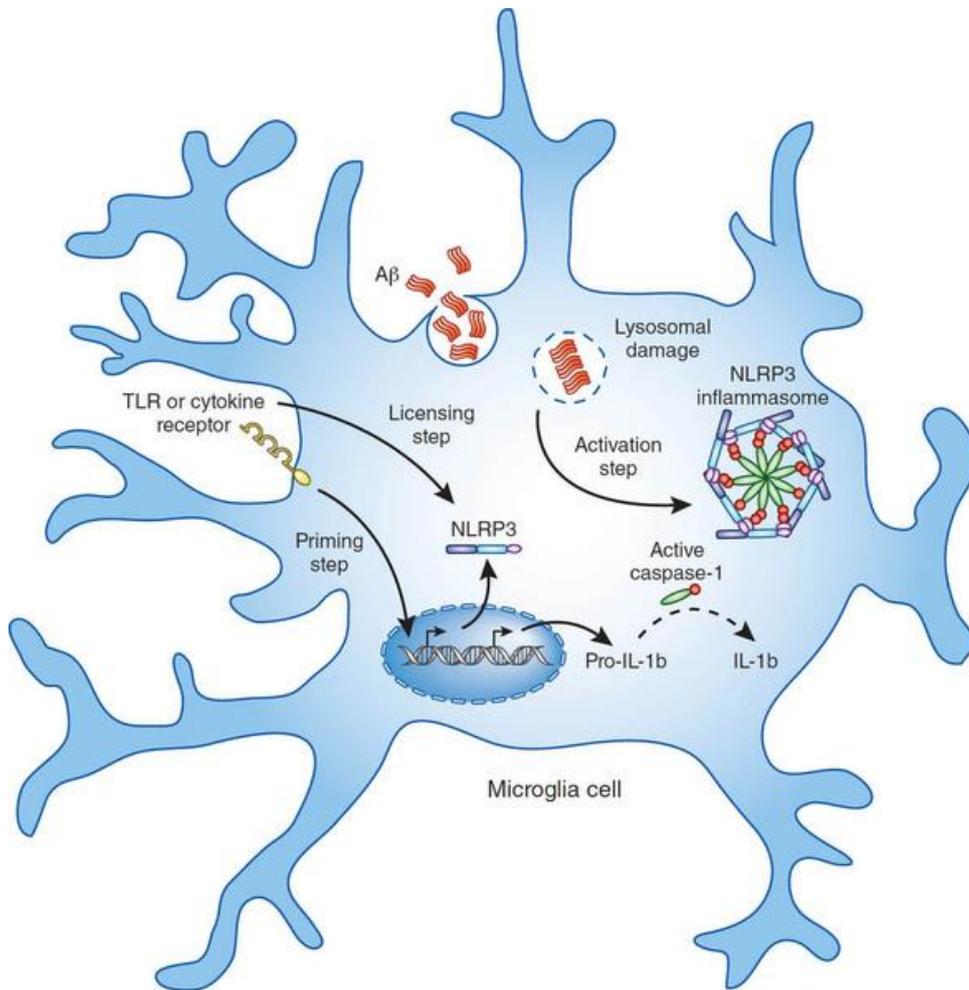


Figure 14: Représentation schématique de l'activation mitochondriale [Heneka *et al.* 2015a]

Les plaques amyloïdes sont également capables d'activer le système du complément qui va à son tour stimuler la phagocytose. Des modifications de l'expression du récepteur du complément CR1 pourrait entrainer une perturbation de l'élimination des débris cellulaires et des peptides A $\beta$  [Lambert *et al.* 2009]. CR1 se lie aux autres facteurs du complément C3b et C4b, et régule l'activation du complément. De plus, ces molécules sont présentes à des concentrations plus élevées dans le LCR de patients MA par rapport aux MCI [Daborg *et al.* 2012].

Les cellules microgliales expriment également TREM2 (*triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) associé à la protéine adaptatrice TYROBP (DAP12) et le CD33 (Siglec-3). Le TREM2 et le CD33 sont impliqués dans la clairance des plaques par phagocytose et des polymorphismes au sein de leur gène, en plus du CR1, ont récemment été identifiés comme étant des facteurs de risque pour la maladie. Il a été montré que le CD33 inhibe la phagocytose du peptide A $\beta$ 42 par les cellules microgliales. De plus, une expression élevée de cette molécule a été observée chez les patients MA [Griciuc *et al.* 2013]. Une altération de la fonction de TREM2 inhibe la phagocytose, augmente la production de facteurs pro-inflammatoires et contribue à la dégénérescence [Kleinberger *et al.* 2014]. Cependant des données récentes suggèrent que les facteurs anti-inflammatoires peuvent également avoir un effet délétère sur la progression de la maladie. En effet, dans des modèles murins de la MA, l'augmentation d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, a entraîné une augmentation de la charge amyloïde (A $\beta$  soluble et insoluble), et inversement, la délétion de l'IL10 a induit une diminution de la pathologie amyloïde (A $\beta$  soluble et insoluble). De façon intéressante, le recrutement des cellules microgliales autour des plaques et la phagocytose des peptides A $\beta$  augmentent en absence d'IL10 [Guillot-Sestier *et al.* 2015;Chakrabarty *et al.* 2015]. Globalement ces deux études montrent que l'IL-10 accélère la progression de la maladie en modulant la fonctionnalité des cellules microgliales.

L'ensemble de ces données indiquent que les cellules microgliales ont une activité phagocytaire bénéfique au cours du processus neuroinflammatoire, puisqu'elles débarrassent le parenchyme cérébral des dépôts amyloïdes. Cependant, avec la progression de la maladie, la capacité de phagocytose de ces cellules est réduite dans un environnement proinflammatoire persistant. Une production prolongée de cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IL6, IL1 $\beta$ , modifie le profil des cellules microgliales phagocytaires M2 vers un profil pro-inflammatoire M1. Cela entraîne une production exacerbée de facteurs inflammatoires et toxiques qui entretient le statut inflammatoire chronique. Un tel environnement est délétère pour les neurones et entraîne également une altération des fonctions astrocytaires aboutissant à une aggravation du mécanisme dégénératif. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire produit par ces cellules semble contribuer à la diminution de la phagocytose. Ces réponses proinflammatoires et anti-inflammatoires à la fois bénéfiques et délétères, soulignent la complexité des réponses immunitaires innées au cours de la MA et dans d'autres maladies neurodégénératives.

Les astrocytes sont également impliqués dans les réponses immunitaires au cours de la MA. A la suite d'une lésion, ils s'activent et deviennent hypertrophiés. Ils augmentent le nombre de prolongements et leur expression de GFAP. Une astrogliose est également associée à la MA. Les astrocytes activés s'accumulent aux côtés des cellules microgliales autour des plaques. Comme les cellules microgliales, au contact des peptides amyloïdes, ils sont capables de dégrader l'A $\beta$  *in vitro* [Wyss-Coray *et al.* 2003] et libérer des cytokines (IL1 $\beta$ , IL6), chimiokines (CCL2, CXCL1, CXCL12), du NO et autres facteurs neurotoxiques. Les fonctions des astrocytes sont compromises pendant les réactions inflammatoires aiguës et par des mécanismes d'excitotoxicité, ce qui entraîne également une réduction de la clairance des peptides A $\beta$  [Ransohoff and Brown 2012].

Dans le cerveau, les astrocytes sont impliqués dans la signalisation neuronale. Les astrocytes interagissent avec les terminaisons nerveuses pré- et post-synaptiques. Dans cette synapse tripartite, le glutamate libéré par la terminaison pré-synaptique se fixe sur ses récepteurs présents sur la terminaison post-synaptique. Le glutamate en excès est recapturé par les astrocytes et peut être réutilisé pour renforcer la LTP. La fonction de recapture du glutamate peut être perturbée dans un contexte de neuroinflammation chronique et altérer la modulation de la transmission synaptique par les astrocytes, le contrôle de la LTP et par conséquent les capacités d'apprentissage et de mémoire [Pereira, Jr. and Furlan 2010].

## **B. Les réponses adaptatives au cours de la MA**

### **1. Les réponses humorales**

De nombreux arguments suggérant l'implication du système immunitaire adaptatif dans la physiopathologie de la MA ont été apportés.

Comme nous l'avons vu dans la partie abordant l'aspect thérapeutique dans la MA, plusieurs données précliniques ont montré l'efficacité d'une immunisation avec le peptide A $\beta$  [Janus *et al.* 2000;Schenk *et al.* 1999], ou l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre le peptide A $\beta$  [Bard *et al.* 2000b;Dodart *et al.* 2002] dans la clairance des plaques et l'amélioration des fonctions cognitives.

Les leçons tirées de l'essai clinique AN1792, précédemment discuté, sont très importantes :

- De façon similaire aux études précliniques, l'immunisation a clairement favorisé la clairance des plaques dans le cerveau des patients analysés *post mortem*.

- La production d'anticorps anti-A $\beta$  a été observée et corrélée avec l'amélioration des fonctions cognitives chez certains patients.

Ces observations suggèrent donc que le système immunitaire adaptatif pourrait avoir un rôle bénéfique ou délétère. Elles soulignent également l'importance de l'étude des réponses anticorps chez les malades et les patients âgés, mais également de la caractérisation des réponses lymphocytaires T au cours de la maladie.

De façon intéressante des anticorps naturels anti-A $\beta$  seuls ou complexés avec des peptides A $\beta$  sont présents dans le sang et le LCR au cours du vieillissement et chez les patients MA. Néanmoins, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre. Certains montrent une augmentation [Nath *et al.* 2003], une diminution [Du *et al.* 2001] ou un niveau similaire [Hyman *et al.* 2001] de la quantité d'anticorps anti-A $\beta$  présents chez les patients MA comparés aux sujets âgés sains. Une étude a montré, dans le cerveau de patients que les auto-anticorps sont retrouvés fixés sur les plaques neuritiques, indiquant que les anticorps naturels anti-A $\beta$  s'attaquent bien aux peptides amyloïdes. Des cellules microgliales activées (CD68<sup>+</sup>) ont également été détectées à proximité des plaques. De plus, un fort taux d'anticorps dans le cerveau des patients a été corrélé avec une diminution de la pathologie amyloïde [Kellner *et al.* 2009]. Ces résultats suggèrent un rôle bénéfique des autoanticorps dans la physiopathologie de la MA.

L'administration de ces autoanticorps ciblant principalement les monomères à des souris transgéniques rétablit leurs fonctions cognitives [Dodel *et al.* 2011] et confirment leur effet bénéfique et leur utilisation potentielle en thérapie. D'ailleurs des essais basés sur l'utilisation des auto-anticorps sont en cours d'évaluation (IVIg *intravenous immunoglobulin*) [Dodel *et al.* 2013].

## 2. Les réponses cellulaires

Plusieurs études suggèrent une implication des cellules T dans la physiopathologie de la MA. Togo *et al.* ont rapporté la présence de cellules T dans le cerveau de patients MA. Les cellules T CD3<sup>+</sup> sont principalement localisées dans l'hippocampe, sans aucune corrélation avec les dépôts amyloïdes et les DNFs. Le nombre cellules CD3<sup>+</sup> chez ces patients varie d'un cas à l'autre et n'est pas corrélé avec le stade de la maladie. Les cellules T dans cette étude sont principalement des T mémoires (CD45RO<sup>+</sup>) avec une majorité de cellules CD8<sup>+</sup> et pas de cellules CD25<sup>+</sup> parmi les CD4<sup>+</sup>. Elles sont toutes négatives pour le Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire) [Togo *et al.* 2002]. Contrairement aux résultats de Togo *et al.*, une

étude récente a mis en évidence une corrélation entre l'infiltration en cellules T CD3<sup>+</sup> et la pathologie Tau chez les patients MA [Zotova *et al.* 2013]. Très récemment, une étude a montré une augmentation de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activées dans le sang et dans le LCR de patients AD comparés aux sujets âgés sains. De façon intéressante, le nombre de LT CD8<sup>+</sup> activés est corrélé avec les déficits cognitifs observés chez les patients. De plus, l'augmentation du nombre de cellules T activées déjà visible au stade MCI suggère que le phénotype des cellules T est déjà modifié à un stade précoce de la maladie [Lueg *et al.* 2015].

Des analyses génomiques récentes montrant l'implication des cellules T dans la physiopathologie de la maladie ont été publiées. Ces arguments forts suggèrent un polymorphisme dans la présentation antigénique (molécules du CMH-I et II) et la susceptibilité à développer la maladie d'Alzheimer [Jones *et al.* 2010 ; Lambert *et al.* 2010 ; Lambert *et al.* 2013].

L'essai clinique d'immunisation active anti-A $\beta$  initié chez des patients a entraîné des réactions inflammatoires graves chez une partie de la cohorte de patients MA, expliquant l'arrêt de l'essai clinique. La survenue des cas de méningoencéphalites a montré un effet délétère potentiel des que les cellules T anti-A $\beta$ .

Cependant, plusieurs études dans des modèles murins de la maladie ont montré que les cellules T, particulièrement les LT CD4<sup>+</sup> peuvent avoir un effet bénéfique dans la progression de la maladie. La réactivité des cellules TCD4<sup>+</sup> pour le peptide A $\beta$  augmente chez les personnes âgées et chez les patients MA. Cela implique la présence de LT spécifiques de l'A $\beta$  circulant chez les patients MA, et suggère l'existence d'une réponse spontanée des cellules T anti-A $\beta$  chez les patients [Monsonogo *et al.* 2003]. Dans les modèles murins de la maladie, les cellules TCD4<sup>+</sup> induites par l'immunisation avec le peptide A $\beta$  favorisent la clairance des plaques [Monsonogo *et al.* 2006;Fisher *et al.* 2010]. Et le transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du peptide A $\beta$  améliore les fonctions cognitives [Ethell *et al.* 2006;Cao *et al.* 2009]. Les cellules Th1 anti-inflammatoires injectées dans le LCR (ventricule latéral), migrent vers le parenchyme cérébral où elles ont une fonction d'immunosurveillance.

Cependant des réponses délétères des cellules Th1 ont également été observées chez les modèles murins. La production d'IFN $\gamma$  par ces cellules entraîne une aggravation de la pathologie amyloïde, augmente les déficits cognitifs [Browne *et al.* 2013] et est également associée à une méningoencéphalite [Monsonogo *et al.* 2006].

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle complexe des cellules T dans la MA, avec des effets potentiellement bénéfiques mais aussi délétères. Comprendre les facteurs qui ont entraîné la survenue de 6% de cas de méningoencéphalite au cours de l'essai AN1792 est

primordial afin de pouvoir développer des stratégies de vaccinations sûres. Il est également important de comprendre les mécanismes de régulation de l'amplitude de ces réponses.

### 3. Caractérisation et plasticité des cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du système immunitaire et dans le contrôle des réponses immunitaires [Sakaguchi *et al.* 2010a] ces cellules sont impliquées dans :

- La prévention contre les maladies autoimmunes en établissant et en maintenant la tolérance au soi et l'homéostasie du système immunitaire
- Le contrôle et la résolution des réponses effectrices
- La suppression des allergies
- L'induction de la tolérance contre les antigènes alimentaires (tolérance orale)
- L'induction de la tolérance maternelle vis-à-vis du fœtus
- La suppression des réponses immunitaires contre les pathogènes commensaux
- L'induction de la tolérance vis-à-vis de greffes allogéniques
- Le contrôle (inhibition) des réponses suppressives anti-tumorales

L'importance des Tregs dans l'homéostasie immunitaire est soulignée par la survenue de maladies auto-immunes quand la réactivité et la fréquence de ces cellules sont altérées [Sakaguchi *et al.* 1995b].

La fonctionnalité des Tregs est contrôlée par le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box protein 3*) dont le gène est localisé sur le chromosome X. Ce facteur est nécessaire au développement, au maintien et à la fonction des Tregs. Une mutation dans le gène Foxp3 peut entraîner une réponse auto-immune fatale pour l'organisme (la souris scurfy, et chez l'homme le syndrome IPEX (immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X)).

Cependant, la seule expression de Foxp3 ne suffit pas à maintenir la fonction suppressive des Tregs. D'autres molécules exprimées par ces cellules permettent de stabiliser l'expression de Foxp3 et de maintenir leur activité suppressive. C'est le cas de CD25 (chaîne  $\alpha$  de haute affinité du récepteur à l'IL2), CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte Antigen 4*), GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) également connu sous le nom de TNFRSF18 (*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18*), ICOS (*Inducible T cell costimulator*).

Il existe plusieurs sous populations de Tregs, qui sont nommées selon leur site d'induction. La plupart des Tregs sont générés dans le thymus sont appelés tTregs (souvent appelés Tregs naturels) et produisent de l'IL-10, du TGFβ et de l'IL-35. Les Tregs induits en périphérie à partir de la population de cellules T conventionnels Foxp3<sup>-</sup> sont appelés pTregs. Les Tregs peuvent également être générés *in vitro* en présence de TGFβ sont appelés iTregs (Tregs induits *in vitro*) [Abbas *et al.* 2013]. Les T régulateurs 1 ou Tr1 [Groux *et al.* 1997] et les T helper 3 ou Th3 [Chen *et al.* 1994] peuvent être générés *in vitro* ou *in vivo* en présence d'IL2, d'IL10 et de TGFβ (Figure 15).

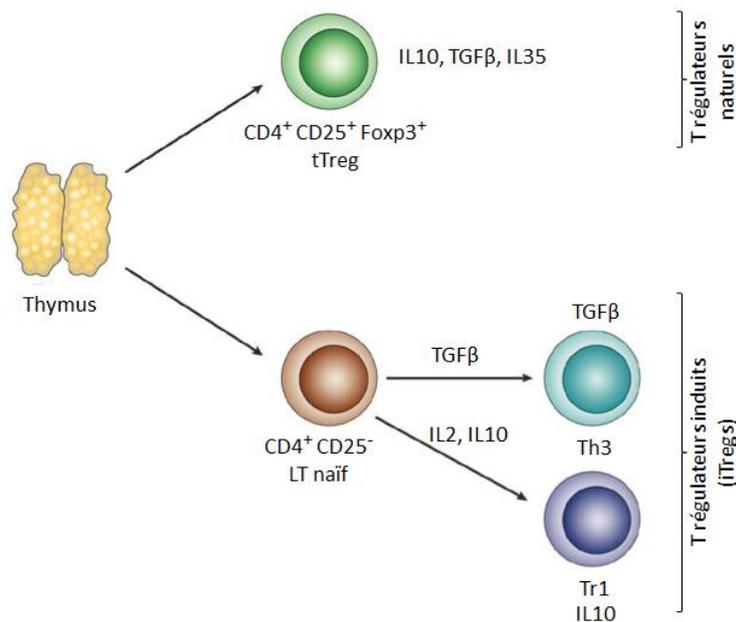


Figure 15: Les sous populations de cellules T régulatrices.

Les facteurs connus pour favoriser le développement et la survie des Tregs sont le TGFβ, l'IL-2 et les molécules de co-stimulation telles que le CD28. L'IL-2 joue un rôle critique dans l'activation, la prolifération et la stabilité des Tregs. La déficience en IL-2 entraîne une activation et une prolifération incontrôlées des T CD4<sup>+</sup> chez la souris [Sadlack *et al.* 1995]. De plus, il a été montré que l'IL-2 est essentiel dans l'intégrité de la fonction suppressive des Tregs [Zheng *et al.* 2007].

Les Tregs sont localisés dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (foie, peau, poumons, muqueuses...). Les Tregs centraux circulant dans les organes lymphoïdes ont un profil naïf, tandis que les Tregs circulants dans les tissus non lymphoïdes ont un phénotype

effecteur. De façon similaire aux cellules T conventionnelles, certains marqueurs permettent de distinguer les Tregs naïfs des Tregs effecteurs.

Chez la souris l'expression forte de CCR7, de CD62L et une expression faible du CD44 est caractéristique des Tregs naïfs, tandis qu'une expression faible de CCR7, du CD62L, et une forte expression du CD44 caractérise les Tregs effecteurs. Ces derniers expriment en plus ICOS, GITR ainsi que d'autres molécules telles que CD69, CD103 et CD38. Les Tregs peuvent être identifiés grâce à leur forte expression de CD25, mais un marquage intracellulaire du Foxp3 intracellulaire est également réalisé afin d'exclure les cellules T conventionnelles activées qui expriment fortement elles aussi le CD25 mais pas de Foxp3.

En revanche, chez l'homme, il est impossible de se baser sur l'expression du CD25, étant donné que le niveau d'expression de cette molécule est hétérogène et varie d'une population de Tregs à l'autre. Par conséquent, d'autres marqueurs sont utilisés. Le CD127 en combinaison avec CD25 et CD62L permet de distinguer les Tregs  $CD25^{hi}CD127^{low}CD62L^{+}$  des LT conventionnels activés  $CD25^{hi}CD127^{low}CD62L^{low}$ .

Populations de Tregs	Souris	Homme
<b>Tregs naïfs</b>	$CD25^{+} Foxp3^{+} CD44^{lo} CCR7^{hi}$ $CD62L^{hi}$	$CD25^{hi} Foxp3^{low} CD45RA^{hi}$ $CD45RO^{-} CD127^{low/-} HLA-DR^{-}$ $CD95^{-} CTLA4^{-}$
<b>Tregs effecteurs</b>	$CD44^{hi} CD25^{+} CD45RB^{lo} CCR7^{lo}$ $CD62L^{lo/-} ICOS^{+} GITR^{+} CD69^{+}$	$CD25^{hi} Foxp3^{hi} CD45RA^{low/-}$ $CD45RO^{hi} CD127^{low} HLA-DR^{-}$ $CD95^{+} CTLA4^{+} GITR^{+} Ki67^{+}$ $ICOS^{+/-} CD62L^{lo}$
<b>Tregs effecteurs terminaux</b>	$CD103^{+} CD38^{+} KLRG1^{+} CTLA4^{+}$	$CD25^{hi} Foxp3^{hi} CD45RA^{low/-}$ $CD45RO^{hi} CD127^{-} HLA-DR^{+}$ $CD95^{+} CTLA4^{+} Ki67^{+} ICOS^{+/-}$ $CD62L^{+}$

Tableau 2: Les différents marqueurs phénotypiques des différentes populations de Tregs

Les Tregs naïfs sont  $Foxp3^{low}CD45RA^{hi}CD25^{hi}CD45RO^{-}$ , tandis que les Tregs effecteurs ou activés sont  $Foxp3^{hi} CD45RA^{low}CD25^{hi}CD45RO^{hi}$ . Les Tregs activés expriment également CD95 (récepteur de la molécule Fas ligand), CTLA-4, ICOS et d'autres molécules d'activation [Sakaguchi *et al.* 2010b].

Une description non exhaustive des différentes populations de Tregs chez l'homme et chez la souris est proposée dans le Tableau 2.

Des études récentes ont montré que les Tregs peuvent se différencier et acquérir la capacité de moduler de façon spécifique les réponses immunitaires de type Th1, Th2 ou Th17, en modifiant leur expression des facteurs de transcription contrôlant ces populations cellulaires, respectivement Tbet [Koch *et al.* 2009], Gata3 [Wohlfert *et al.* 2011] et Stat3 [Chaudhry *et al.* 2009].

#### **4. Les fonctions effectrices des cellules T régulatrices**

Différents mécanismes d'inhibition des réponses cellulaires T sont utilisés par les Tregs. Ils peuvent agir directement sur les cellules effectrices

- Par la limitation des activités effectrices des autres cellules T en réduisant la disponibilité de facteurs trophiques (IL2) via le CD25 fortement exprimé sur les Tregs (Figure 16c).
- Par hydrolyse de l'ATP par le biais d'ectoenzymes exprimées à la surface des Tregs (CD39 et CD73). Une augmentation de la concentration extracellulaire en ATP est un signal de lésion tissulaire entraînant une libération d'ATP par les cellules. Ces ectoenzymes induisent la production d'adénosine péri-cellulaire et l'activation des récepteurs à adénosine 2A (A<sub>2A</sub>R), entraînant l'inhibition des réponses effectrices (Figure 16c), [Deaglio *et al.* 2007].

Les Tregs peuvent agir indirectement sur les cellules T par la modulation fonctionnelle des DCs

- Par le biais de cytokines inhibitrices (IL35, IL10, TGFβ) ou de molécules cytotoxiques (perforine et granzyme A/ B) (Figure 16a et b). L'IL10 inhibe la production de TNF et d'IL12 par les DCs et les macrophages ainsi que leur expression du CMH II et des molécules de co-stimulation [Mills 2004].
- Par le biais du CTLA4 et le LAG3 exprimés à la surface des Tregs (Figure 16d). Le CTLA4 reconnaît les molécules de co-stimulation à la surface des DCs et rend ces molécules indisponibles pour les T effecteurs, ce qui limite leur expansion. Le LAG3 (*lymphocyte activation gene 3*), une autre molécule inhibitrice exprimée à la surface des Tregs, reconnaît le CMH-II avec une forte affinité. Cette liaison à la surface des DCs immatures inhibe leur maturation et leur capacité stimulatrice.

D'autres molécules inhibitrices exprimées à la surface des cellules T effectrices et/ou des cellules myéloïdes peuvent aussi être impliquées dans la fonction suppressive des Tregs : PD1 (*programmed cell death protein*) et son ligand PD1-L, la neuropiline (Nrp1), CD95 et son ligand CD95L.

– Les Tregs peuvent également induire la production de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DCs. L'IDO est connu pour sa capacité à cataboliser le tryptophane (un acide aminé essentiel pour les cellules), en métabolites pro-apoptiques. Cela entraîne une inhibition de l'activation des cellules T effectrices.

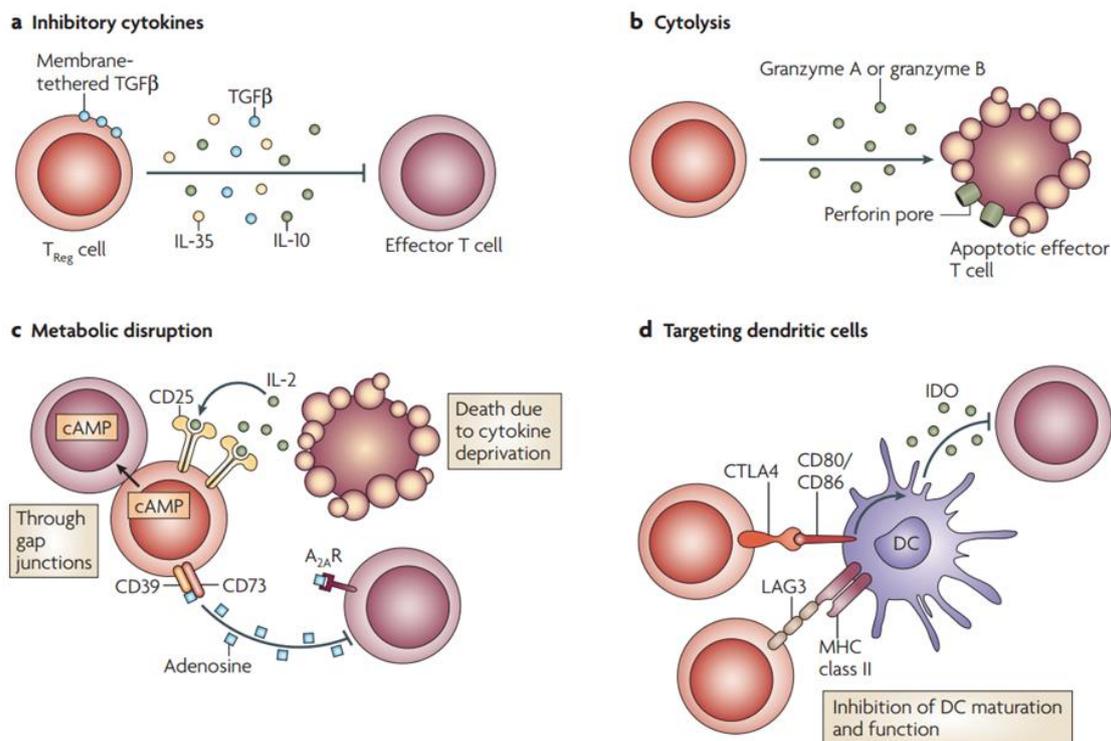


Figure 16: Fonction régulatrice et mécanismes d'action des cellules T régulatrices [Vignali *et al.* 2008].

La fonction suppressive des Tregs peut être mesurée *in vitro* à l'aide de tests de prolifération lymphocytaire. Dans ces essais, les Tregs sont incubés à différentes concentrations avec les LT conventionnels stimulés (anticorps anti-CD28 et anti-CD3) et des CPAs. Les T conventionnels sont alors marqués avec du CFSE (*Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*), marquant les molécules intracellulaires, dont la dilution permet de suivre les divisions cellulaires. Le CFSE est détectable par cytométrie en flux.

La modulation de la fonctionnalité des Tregs est utilisée dans différentes approches thérapeutiques. Des stratégies de déplétion des Tregs sont à l'étude dans le cadre de cancers, afin de renforcer les réponses anti-tumorales. Le daclizumab est un anticorps anti-CD25 humanisé utilisé en traitement du cancer chez l'homme [Jacobs *et al.* 2010]. Il est souvent utilisé à une dose faible afin d'éviter la déplétion des T effecteurs. Les anti-CTLA4 (ipilimumab) sont également utilisés afin de bloquer les fonctions des Tregs et favoriser l'activité effectrice des cellules T conventionnelles [Wolchok *et al.* 2013].

Dans le domaine des maladies autoimmunes et de la transplantation, c'est une augmentation ou une activation des Tregs qui sont ciblées. Ces effets peuvent être atteints en réalisant des transferts adoptifs de Tregs [Brunstein *et al.* 2011]. Cette méthode, bien qu'efficace dans certains cas, rencontre actuellement des obstacles quant à la pureté des cellules transférées et leur devenir dans un environnement inflammatoire, pouvant avoir un effet inverse de celui recherché. L'accroissement de la population de Tregs peut également être réalisé par administration d'IL-2.

## **5. Rôle de l'IL2 et de ses récepteurs dans le développement et la fonction des Tregs**

Les Tregs sont caractérisés par leur forte expression de CD25 et de Foxp3. Le CD25 est la chaîne  $\alpha$  de haute affinité du récepteur de l'IL2. Ce dernier est essentiel dans l'expansion et le maintien des Tregs, et favorise l'expansion et le développement des réponses effectrices des autres cellules T. Cette molécule est produite en grande majorité par les LT CD4<sup>+</sup> mais aussi par les LT CD8<sup>+</sup>, les DCs, les cellules natural killer (NK) et les NKT activés.

Le récepteur de haute affinité à l'IL-2 est constitué de 3 chaînes polypeptidiques :  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  (CD122 commune aux récepteurs de l'IL-2 et l'IL-5) et  $\gamma$  (CD132 commune aux récepteurs de l'IL-2, 4, 7, 9, 15 et 21). La transduction du signal est assurée par les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$ , tandis que la chaîne  $\alpha$  (CD25) entraîne la formation et stabilise le récepteur de haute affinité correspondant au complexe CD25/CD122/CD132. La fixation de l'IL2 sur le CD25 entraîne le regroupement des autres chaînes du récepteur. S'ensuit alors une transduction du signal via la phosphorylation des kinases Janus (JAK1/3) et l'activation des voies de signalisation STAT5 (*signal transducer and activator of transcription*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et PI3K (*phosphatidylinositide 3-kinase*). En absence de CD25, le signal peut être transduit par le couple CD122/CD132, mais la fixation de l'IL2 est plus faible.

Ce complexe de haute affinité CD25/CD122/CD132 est constitutivement exprimé sur les Tregs, mais aussi sur les T conventionnels (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) activés, qui augmentent leur expression du CD25 après activation. Ce sont donc des cellules susceptibles de répondre de façon efficace à l'IL-2 *in vivo*. Cependant, les autres chaînes sont présentes sur d'autres types cellulaires. Le CD122 et le CD132 sont fortement exprimés sur les cellules NK, qui sont sensibles aux fortes doses d'IL-2 mais également potentiellement sensibles à de faibles doses d'IL2 [Malek 2008].

Les souris déficientes en IL-2 [Sadlack *et al.* 1993], en CD25 [Willerford *et al.* 1995] ou en CD122 [Suzuki *et al.* 1995] développent un syndrome lymphoprolifératif autoimmun pouvant être corrigé par un transfert adoptif de Tregs de souris WT. Les Tregs provenant de souris déficientes en IL-2 ou en CD25 expriment le Foxp3 et sont capables d'avoir une activité suppressive *in vitro*. Cependant, les souris déficientes en CD132 n'ont pas de Tregs. Ces données suggèrent que la présence d'IL-2 n'est pas requise pour le développement et la fonction suppressive des Tregs. En revanche sa signalisation est essentielle pour le maintien de l'expression de Foxp3 et de la fonction des Tregs, de l'homéostasie et de la tolérance en périphérie [Fontenot *et al.* 2005].

Ces observations ont montré le potentiel thérapeutique de l'IL-2 dans de nombreuses pathologies autoimmunes et cancers. Dans les premiers essais cliniques qui ont été mises en place chez des patients atteints de cancers métastatiques, de fortes doses d'IL-2 (126-125 Million Unité Internationale/ jour) étaient utilisées. Ce traitement s'est révélé toxique et même létale chez certains patients.

Plus récemment, l'utilisation de faibles doses d'IL-2 dans d'autres études cliniques et précliniques a montré un effet bénéfique chez l'homme (1,5-3 MUI/ jour) et dans des modèles murins (25000-50000 UI/jour), dans le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte [Koreth *et al.* 2011;Matsuoka *et al.* 2013], de la vascularite induite par le virus de l'hépatite C [Saadoun *et al.* 2011] et le traitement du diabète de type1 [Grinberg-Bleyer *et al.* 2010]. Ces études ont montré qu'une faible dose d'IL-2 permet de cibler préférentiellement les Tregs plus sensibles à l'IL-2 que les T conventionnels. L'IL-2 induit l'activation, la prolifération et l'augmentation de l'activité suppressive des Tregs, en sollicitant préférentiellement la voie de signalisation de STAT5.

## **6. Les cellules T régulatrices dans le SNC et au cours de la MA**

Le rôle des Tregs va au-delà du contrôle des réponses autoimmunes. Leur rôle central dans le contrôle des réponses immunes fait de ces cellules un outil thérapeutique potentiel

principalement dans le contexte de cancers et de maladies autoimmunes, comme le diabète de type 1.

L'implication des Tregs dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives a été beaucoup moins étudiée. Les Tregs auraient un effet bénéfique dans la physiopathologie de diverses maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique. Une augmentation des Tregs chez les patients SLA au stade précoce et stable de la maladie a été rapportée, associée à une augmentation de la production d'IL4 et à l'augmentation de cellules microgliales de type M2. La fréquence des Tregs diminue ensuite avec l'accélération de la maladie [Beers *et al.* 2011; Zhao *et al.* 2012]. Dans les modèles murins de la MP, les Tregs ont également un rôle protecteur en atténuant la neuroinflammation et la dégénérescence des neurones dopaminergiques via la production de facteurs neurotrophiques par les astrocytes (BDNF et GDNF) [Reynolds *et al.* 2007]. Les Tregs favorisent également la réparation des tissus lésés dans le parenchyme cérébral [Raposo *et al.* 2014]. Ces études suggèrent que globalement ces cellules ont plutôt un rôle positif au cours des événements pathologiques dans le SNC.

L'impact des Tregs dans la MA est mal compris, et des résultats contradictoires ont été rapportés par différents groupes. Des données précédentes suggèrent une augmentation de l'activité suppressive chez des patients comparés aux témoins âgés [Rosenkranz *et al.* 2007b]. A l'inverse, une diminution globale de la fréquence des LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> et une modification du ratio des cellules T naïves/ cellules T mémoires dans la population totale de cellules T, ont été décrites chez les patients au stade léger de la maladie comparés aux sujets âgés témoins [Larbi *et al.* 2009]. Une autre étude a montré que la fréquence des cellules Tregs PD1<sup>-</sup>, hautement suppressives, était augmentée chez les patients MCI, mais pas chez les patients au stade sévère de la maladie. De plus, l'activité suppressive des Tregs est plus efficace chez les patients MCI par rapport aux sujets âgés contrôles [Saresella *et al.* 2010].

Dans un modèle murin de la maladie, nous avons précédemment montré que les Tregs contrôlent de façon critique l'amplitude des réponses LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$ , dans un contexte physiologique, pathologique et en réponse à la vaccination. De façon intéressante, l'amplitude de l'inhibition de ces réponses LT CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  varie fortement d'un fond génétique à l'autre. Cela suggère que la variabilité génétique entre individus peut entraîner une modulation différentielle de la pathogenèse de la maladie et/ou de la réponse à la vaccination A $\beta$ , par les Tregs [Toly-Ndour *et al.* 2011].

L'ensemble de ces résultats suggère une implication des Tregs dans la physiopathologie de la maladie, mais leur impact sur la progression de la maladie n'est pas encore connu.

## OBJECTIFS & RESULTATS

## I. Objectif

Le peptide A $\beta$  constitue une cible privilégiée dans plusieurs stratégies thérapeutiques. Parmi celles-ci, les approches d'immunothérapies anti-amyloïdes ont montré des résultats prometteurs. L'immunisation active dans des modèles murins de la maladie montre une efficacité dans la clairance des plaques et l'atténuation des troubles cognitifs. Ces résultats encourageants ont rapidement été suivis par un premier essai clinique basé sur une vaccination anti-A $\beta$  (AN1792). Ce dernier a été arrêté suite à la survenue de plusieurs cas de méningoencéphalites, imputée à des réponses T pro-inflammatoires, chez les patients vaccinés. Ces réponses lymphocytaires T induites par la vaccination, suggèrent un effet délétère de ces cellules dans le cadre de cette maladie.

Cependant, des études récentes ont montré que les réponses T dans le cadre de la MA, sont plus complexes qu'il n'y paraît et qu'au moins certaines populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pourraient avoir un effet bénéfique sur la physiopathologie de la maladie.

Nous avons vu dans l'introduction que dans un contexte vaccinal les cellules TCD4<sup>+</sup> pouvaient améliorer l'élimination des plaques A $\beta$  et même ralentir le déclin cognitif. D'autre part, certaines études ont montré que la réactivité des cellules T au peptide A $\beta$  augmente avec l'âge chez des sujets sains et chez des patients AD. Par ailleurs, il a également été montré que l'infiltration des cellules T dans le cerveau augmente au cours du vieillissement, chez les modèles murins de la maladie mais également chez les patients AD.

Les études génomiques récentes confirment l'implication des cellules T dans la MA et mettent en évidence un lien entre le polymorphisme dans les gènes de la présentation antigénique et la susceptibilité à développer la maladie d'Alzheimer.

Cette dualité fonctionnelle des cellules T CD4<sup>+</sup> au cours de la maladie souligne la complexité des réponses T et la nécessité de mieux caractériser les réponses lymphocytaires T dans la physiopathologie de la MA.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont caractérisées par leur diversité et leur complexité. Les Th1 produisent des facteurs proinflammatoires tels que l'IL6, IL1, le IFN $\gamma$ , et médient les réponses contre les pathogènes intracellulaires et les virus. Les Th2 produisent des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL4, l'IL5, l'IL10, l'IL13 et sont principalement responsables des réponses contre les pathogènes extracellulaire. Les Th17 produisent de l'IL17, le TNF $\alpha$  et de l'IL22 et sont également impliqués dans les réponses contre les pathogènes extracellulaires. Il a été montré que ces cellules sont impliquées dans les évènements inflammatoires dans

plusieurs affections cérébrales. Il est important d'étudier de façon plus approfondie, le rôle des différentes populations de T CD4<sup>+</sup> au cours de la maladie, et de connaître les différents facteurs et mécanismes de régulation de l'intensité de leurs réponses. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés aux cellules T régulatrices.

Nous avons vu précédemment que les Tregs se positionnent dans le système immunitaire comme de véritables chefs d'orchestre, contrôlant les réponses du système immunitaire inné et adaptatif. Par conséquent, ils pourraient être impliqués dans les pathologies inflammatoires du SNC. En effet, lors de lésions de la moelle épinière, les Tregs auraient un rôle immunosupresseur négatif en contenant les réponses des cellules T autoréactives (autoimmunité protectrice). En revanche dans le cadre de maladies neurodégénératives telles que la SLA et la MP, un rôle protecteur de ces cellules a été montré, ainsi que dans la SEP, une pathologie auto-immune.

Notre équipe a récemment mis en évidence le rôle critique des Tregs dans la modulation des réponses T CD4<sup>+</sup> anti-A $\beta$  dans les conditions physiologiques et pathologiques, mais également en réponse à la vaccination [Tolly-Ndour *et al.* 2011].

L'objectif principal de mon projet de thèse est de caractériser le rôle de ces cellules régulatrices dans la progression de la MA. Dans le modèle murin APPPS1, nous avons étudié l'effet de la déplétion précoce ou de l'amplification des Tregs sur la physiopathologie de la MA. Nous avons plus particulièrement étudié l'effet de ces différents traitements sur la pathologie amyloïde, la neuroinflammation et les fonctions cognitives.

L'injection par voie intra-péritonéale de l'anticorps anti-CD25 (clone PC61 IgG1 de rat) est une des stratégies utilisée dans notre étude. A 1 et 2 mois, les souris APPPS1 ou WT sont traitées avec de l'anti-CD25 ou le contrôle IgG1.

Les anticorps anti-CD25 sont largement utilisés pour caractériser les fonctions des Tregs *in vitro* et *in vivo*, ainsi que dans différents contextes pathologiques. Ces anticorps ont été utilisés par l'équipe de Sakaguchi dans leur première description des Tregs [Sakaguchi *et al.* 1995a]. Le mode d'action des anticorps anti-CD25 dépend du clone utilisé. Ainsi Kohm et ses collègues dans une étude très controversée ont suggéré une inactivation fonctionnelle plutôt qu'une déplétion des Tregs [Kohm *et al.* 2006]. Une autre étude a montré que le clone 7D4 utilisé dans l'étude précédente réduit fortement le nombre de cellules CD25<sup>+</sup>, mais n'entraîne pas de déplétion de Tregs Foxp3<sup>+</sup> contrairement au clone PC61 [Stephens and Anderton

2006]. Le mécanisme d'action de ce dernier serait médié par les macrophages via leur récepteur Fc $\gamma$ III [Setiady *et al.* 2010].

De nombreuses études ont montré le potentiel thérapeutique de l'IL-2 dans de nombreuses maladies autoimmunes et inflammatoires. Nous avons donc administré par voie intrapéritonéale de faibles doses d'IL-2 recombinante humaine (50000 UI) aux souris selon deux protocoles d'injection. Dans le protocole aigu, une seule série d'injection d'IL-2 est réalisée pendant 10 jours, tandis que le protocole chronique a consisté en une injection d'IL-2 d'abord pendant 10 jours et ensuite toutes les 3 semaines pendant 5 jours jusqu'au sacrifice de la souris.

Ces deux stratégies d'études de l'implication des Tregs dans la physiopathologie de la MA ont été réalisées dans le modèle murin APPPS1. Ce modèle murin porte deux mutations liées à des formes familiales de la maladie : la PS1-L166P et l'APP KM670/671NL.

La PS1-L166P est la forme mutée de la PS1 la plus agressive identifiée dans les formes familiales de la MA. Dans cette mutation, la proline remplace la leucine à la position 166 de la préséniline 1 humaine. Dans la mutation de l'APP humaine (isoforme 695) KM670/671NL, la lysine (K) en position 670 est remplacée par l'asparagine (N) et la méthionine (M) en position 671 est remplacée par la leucine (L). Cette mutation est trouvée dans une grande de famille suédoise avec une apparition précoce de la maladie d'Alzheimer. Les deux constructions sont placées sous le contrôle du promoteur Thy 1. Ce dernier est utilisé pour restreindre l'expression de l'hAPP et de la hPS1 dans le cerveau et atteindre un niveau d'expression élevée du transgène spécifique aux neurones. Le fond génétique des souris est le C57BL/6, permettant de minimiser la variabilité génétique. De plus les souris C57BL/6 sont les mieux caractérisées dans le domaine de la neurobiologie du vieillissement [Radde *et al.* 2006].

Dans ce modèle, les premières plaques amyloïdes apparaissent dans le néocortex à 6 semaines, leur nombre et leur taille augmentent avec l'âge de la souris. Les dépôts dans l'hippocampe apparaissent plus tard entre 2 et 3 mois. A 8 mois l'ensemble du cerveau est couvert par les plaques. Aucun dépôt vasculaire significatif de peptides A $\beta$  n'est observé chez ces souris, certainement du fait du ratio élevé A $\beta$ 42/A $\beta$ 40.

Une astrogliose, une microgliose ainsi qu'une production de facteurs inflammatoires ont été observées dès 4 mois. Les troubles cognitifs sont également précoces et apparaissent dès 8 mois. Les dégénérescences neurofibrillaires et les dépôts vasculaires n'étant pas observés, ce modèle nous permet uniquement de travailler sur la base de l'hypothèse amyloïde.

## II. Résultats

### A. Article1: Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology

Mes travaux de thèse ont essentiellement porté sur l'étude de l'impact de la déplétion des Tregs sur la maladie. L'effet de l'amplification des Tregs a fait l'objet d'un autre projet de thèse mené au laboratoire. Cependant ces deux parties sont complémentaires et ont été mises en commun afin de générer un article.

### Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology

**Cira Dansokho**<sup>1,2\*</sup>, Dylla Ait Ahmed<sup>1,2\*</sup>, Saba Aid<sup>2,3\*</sup>, Cécile Toly-Ndour<sup>1,2\*</sup>, Thomas Chaigneau<sup>1,2</sup>, Vanessa Calle<sup>1,2</sup>, Nicolas Cagnard<sup>4</sup>, Martin Holzenberger<sup>2,3</sup>, Eliane Piaggio<sup>5,6</sup>, Pierre Aucouturier<sup>1,2</sup>, Guillaume Dorothée<sup>1,2</sup>.

*Soumis après révisions mineures (Brain)*

<sup>1</sup> INSERM, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Laboratory *Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases*, Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, F-75012, Paris, France.

<sup>3</sup> INSERM, UMRS 938, CdR Saint-Antoine, Laboratory *Neuroendocrine mechanisms of longevity and age-related diseases*, Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France.

<sup>4</sup> Bioinformatics Platform, Faculty of Medicine Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, F-75015 Paris, France.

<sup>5</sup> INSERM, U932, Institut Curie, Section Recherche; Center of Clinical Investigation (CIC-BT-507), F-75005, Paris, France.

<sup>6</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR7211, *Immunology-Immunopathology-Immunotherapy*, F-75013 Paris, France.

Address correspondence to: Dr. Guillaume Dorothée, INSERM UMRS 938, Laboratory *Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative diseases*, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012, Paris, France. Tel + 33 1 49 28 46 20; guillaume.dorothee@inserm.fr.

*Running title:* Beneficial Tregs in Alzheimer's disease

## **Abstract**

Recent studies highlight the implication of innate and adaptive immunity in the pathophysiology of Alzheimer's disease, and foster immunotherapy as a promising strategy for its treatment. Vaccines targeting amyloid- $\beta$  peptide provided encouraging results in mouse models, but severe side effects attributed to T cell responses in the first clinical trial AN1792 underlined the need for better understanding adaptive immunity in Alzheimer's disease. We previously showed that regulatory T cells critically control amyloid- $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in both physiological and pathological settings. Here, we analyzed the impact of regulatory T cells on spontaneous disease progression in a murine model of Alzheimer's disease. Early transient depletion of regulatory T cells accelerated the onset of cognitive deficits in APPPS1 mice, without altering amyloid- $\beta$  deposition. Earlier cognitive impairment correlated with reduced recruitment of microglia towards amyloid deposits and altered disease-related gene expression profile. Conversely, amplification of regulatory T cells through peripheral low-dose IL-2 treatment increased numbers of plaque-associated microglia, and restored cognitive functions in APPPS1 mice. These data suggest that regulatory T cells play a beneficial role in the pathophysiology of Alzheimer's disease, by slowing disease progression and modulating microglial response to amyloid- $\beta$  deposition. Our study highlights the therapeutic potential of repurposed IL-2 for innovative immunotherapy based on modulation of regulatory T cells in Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer's disease; regulatory T cells; microglia; immunotherapy

**Abbreviations:** A $\beta$  = amyloid- $\beta$ ; CP = choroid plexus; IFN = interferon; Teffs = effector T cells; Tregs = regulatory T cells

## Introduction

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and cognitive functions. Neuropathological features include extracellular deposits of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide, intraneuronal neurofibrillary tangles, and chronic neuroinflammation associated with astrogliosis and microgliosis. Active immunization against A $\beta$  proved efficient at preventing A $\beta$  deposition and reversing cognitive deficits in murine models of the disease (Schenk *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000). Subsequent AN1792 clinical trial of A $\beta$  vaccination was halted after the occurrence of meningoencephalitis in 6% of vaccinated patients. These severe side effects were attributed to vaccine-induced T cell responses, suggesting a detrimental role of A $\beta$ -specific T cells in the context of Alzheimer's disease (Nicoll *et al.*, 2003; Orgogozo *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2004). Later reports in mouse models of the disease suggested that CD4<sup>+</sup> T cells might be either detrimental or beneficial depending on the effector type. Whereas vaccine-induced A $\beta$ -specific Th1 cells may promote both enhanced A $\beta$  clearance and encephalitis (Monsonogo *et al.*, 2006), A $\beta$ -specific Th2 cells reverse cognitive decline and synaptic loss in mice with Alzheimer-like pathology (Ethell *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2009). Accumulating evidence also suggest an implication of spontaneous CD4<sup>+</sup> T cell responses in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Genome-wide association studies identified MHC-II-associated polymorphisms as new susceptibility loci for Alzheimer's disease (Jones *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013). These data are in line with previous studies describing increased intracerebral T cell infiltration and enhanced peripheral A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in patients suffering from Alzheimer's disease (Togo *et al.*, 2002; Monsonogo *et al.*, 2003). Together, these studies suggest a complex implication of CD4<sup>+</sup> T cells in the disease, with multiple outcomes that depend on magnitude and functionality of T cell responses at different disease stages.

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) are key modulators of immune responses, which play a critical role in maintaining immunological tolerance to self-antigens and in suppressing excessive immune responses deleterious to the host (Sakaguchi *et al.*, 2008). Tregs were suggested to play a beneficial role in the pathophysiology of various neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis (Reynolds *et al.*, 2010; Beers *et al.*, 2011). The impact of Tregs in Alzheimer's disease is poorly understood, and conflicting results have been reported. Previous studies suggested increased suppressive activity in patients as compared to non-demented controls (Rosenkranz

*et al.*, 2007). In contrast, overall decreased frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> T cells and altered naive/memory ratio within this population were described in patients with mild Alzheimer's disease as compared to age-matched controls (Larbi *et al.*, 2009). Other studies reported that a highly suppressive PD1<sup>-</sup> Treg subpopulation was enhanced in mild cognitive impairment (MCI) but not in patients with severe Alzheimer's disease, and Treg-mediated suppression was more efficient in MCI as compared to such patients and healthy controls (Saresella *et al.*, 2010). In a mouse model of Alzheimer's disease, we previously suggested that Tregs critically control the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses in Alzheimer-like pathology and in response to A $\beta$  vaccination. Importantly, the potency of such Treg-mediated inhibition of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cells strongly vary according to genetic backgrounds, suggesting that intrinsic genetic variations among individuals may result in differential modulation by Tregs of the pathogenesis of Alzheimer's disease and/or response to A $\beta$  vaccination (Toly-Ndour *et al.*, 2011). Altogether, these results suggest an implication of Tregs in the pathophysiology of Alzheimer's disease, but their actual impact on disease progression remains unknown.

In this study, we investigated the role of Tregs in the pathophysiology of the disease independently of vaccination. Using the APPPS1 mouse model, we show that depletion of Tregs accelerates the onset of cognitive deficits triggered by A $\beta$  deposition. Such early cognitive impairment is associated with reduced recruitment of microglia towards amyloid deposits and altered disease-related gene expression profile in the brain. Conversely, selective amplification of Tregs by low-dose IL-2 treatment increases numbers of plaque-associated microglia, and improves cognitive functions in APPPS1 mice.

## **Materials and methods**

### ***Experimental design***

The aim of the study was to investigate the impact of Tregs on spontaneous disease progression in a murine model of Alzheimer-like pathology. APPPS1 mice and littermate controls were used in all experiments, which aimed at analysing the effect on cognitive functions and neuropathology of either depletion or amplification of Tregs. Depletion was induced by intra-peritoneal injection of anti-CD25 antibody (clone PC61); whereas amplification of Tregs was achieved by low-dose IL-2 treatment administered either transiently or chronically. Mice of each genotype were randomly assigned to treatment groups. Separate cohorts of animals were treated in parallel and dedicated to behaviour

studies, neuropathological studies or gene array analysis. Effects of treatments on the frequency of Tregs and other immune populations were confirmed by flow cytometry. Cognitive functions were assessed using the Barnes maze test. Y-maze test was additionally carried out to further assess the impact on cognitive functions after amplification of Tregs. Impact on neuropathology was analysed by immunohistochemistry, ELISA assays, and transcriptome analysis. All behaviour studies and quantifications for neuropathological assessment were carried out blindly. Sample sizes were chosen based on previous experience and similar type of studies previously described by others.

### ***Mice***

APPPS1 transgenic mice (Thy1-APP<sup>KM670/671NL</sup>; Thy1-PS1<sup>L166P</sup>) on C57BL/6 background were kindly provided by Prof. Mathias Jucker (Hertie Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Tübingen, Germany) and maintained by breeding heterozygotes with wild type C57BL/6j mice. Animals were kept under strictly monitored specific and opportunistic pathogen-free conditions. All experimental protocols involving animal studies have been approved by the Charles Darwin Ethical Committee for Animal Studies, and were carried out in compliance with European legislation on animal care and scientific experimentation.

### ***Treg depletion or amplification***

For Treg depletion, four to five week old APPPS1 mice and WT littermates were injected i.p. with 200µg of either purified (BioXCell, West Lebanon, USA) or ascite-derived anti-CD25 depleting monoclonal antibody (clone PC61) diluted in PBS. Control mice were injected with either PBS or 150-200µg of purified control IgG1 (BioXCell). Similar treatments were repeated 4 weeks after the first injection. For amplification of Tregs, six weeks old APPPS1 mice and WT littermates were treated daily for 10 consecutive days with i.p. injections of either PBS or 50,000 IU of recombinant human IL-2 (Proleukin; Novartis, Basel, Switzerland) diluted in PBS. Additional daily treatments for 5 days were repeated every three weeks.

### ***FACS analysis***

The efficiency of treatments for Treg depletion or amplification was monitored by flow cytometry using a combination of surface and intracellular staining. For depletion studies, efficiency was evaluated by quantifying Tregs in the blood the day before injection and 6-7

days following each round of PC61 treatment. Efficiency of IL-2 treatment was monitored in a pilot cohort by quantifying Tregs in the blood, spleen and cLNs the day before the first injection, and 4, 8 and 11 days after. In all studies cells were first incubated with Fc receptor blocking antibody (2.4G2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to avoid non-specific staining. PE-Cy5-conjugated anti-TCR $\beta$  (H57-597), FITC-conjugated anti-CD4 (L3T4), biotinylated anti-CD25 (7D4) and APC-conjugated streptavidin (all from BD Biosciences) were used for cell-surface staining. For intranuclear staining, cells were then fixed, permeabilized and incubated with PE-conjugated anti-Foxp3 (FJK-16s, eBioscience, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's specifications. Fluorescence data were collected on a LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using Flowjo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

### ***DNA microarray analysis***

At four and eight weeks of age, WT and APPPS1 mice received an i.p. injection of PBS or 200  $\mu$ g of anti-CD25 mAb (clone PC61). Brains were harvested at four months of age after transcardiac perfusion with PBS. Cerebellum was removed and total RNA was extracted from hemi-brains using RNeasy lipid tissue midi kit (Qiagen). Following DNase treatment, RNA quality was verified using an Agilent Bioanalyzer and quantity measured with a Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific). Microarray experiments were performed on mouse genome-wide array (WG6 BeadChip, Illumina) comprising 45,282 probes. Data were extracted and Quantile normalized using BeadStudio software (Illumina). Each dataset was derived from three biologically independent replicate samples. The working lists were created by filtering probes with detection p-values  $<0.05$  for at least half of the chips involved in the comparison. Independent samples were compared by two-tailed unpaired Student t-test filtered at p-values  $<0.05$  and by amplitude of expression modulation at a threshold assessed on the variations of the background-flagged probes. Cluster analysis was performed by hierarchical clustering using the Spearman correlation similarity measure and average linkage algorithm. Data were submitted to Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>) to model relationships among genes and proteins and to construct pathways and unveil relevant biological processes.

### ***Real time quantitative PCR***

Total RNA was prepared as described for microarray analysis and 2 $\mu$ g used for cDNA synthesis using RT<sup>2</sup> first strand kit. Quality control of RNA and cDNA samples was assessed

using RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array. Relative expression of specific mRNAs was assessed by SYBR green-based real time quantitative PCR using RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix and ABI 7900HT light cycler (Applied Biosystems). All primers were from validated RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays. Amplification conditions were: 95°C for 10 min, then 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min. A melting curve was generated at the end of amplification cycles for evaluating the specificity of the reaction. Peptidylprolyl isomerase A (*ppia*) was used as a reference housekeeping gene for normalization. All reagents (RT<sup>2</sup> series) used for gene expression analysis were from Qiagen-SA Biosciences. Data were analysed using SDS.2.4 software (Applied Biosystem), Microsoft Excel and GraphPad Prism® software.

### ***Aβ ELISA***

To assess Aβ<sub>1-42</sub> levels, mouse hemi-brains were homogenized at 4°C in Tris buffer (50 mM Tris base pH 7.4, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF; 100 mg tissue per mL) with protease inhibitors (Roche) using a Polytron. Soluble and insoluble Aβ were extracted in 0.4% diethylamine (DEA) and 70% formic acid (FA), respectively. Briefly, crude 10% homogenate was mixed with an equal volume of 0.4% DEA, sonicated, and spun for 1 h at 4°C at 130,000 g using a TLA 50.4 Ti rotor and Optima TL ultracentrifuge (Beckman Coulter, Indianapolis IN, USA). The DEA supernatant was neutralized with 0.5 M tris base (pH 6.8) and the pellet was homogenized in 70% FA, again ultracentrifuged, and FA-containing supernatants neutralized with 1 M tris base (pH 11). Levels of Aβ<sub>1-42</sub> were quantified using anti-human Aβ ELISA (Life Technologies, Saint-Aubin, France), according to manufacturer's instructions.

### ***Immunohistochemistry***

Mice were anesthetized with ketamine (Imalgene) and xylazine (Rompun) in 0.9% NaCl solution, then transcardially perfused with ice-cold PBS, followed by a solution of 4% paraformaldehyde in PBS. Brain was harvested, transferred for 48h at 4°C in a fresh solution of 4% paraformaldehyde, and transferred overnight at 4°C in 30% sucrose/PBS solution. After bisecting along the midline, each hemi-brain was divided into anterior, median and posterior parts by coronal sectioning. Each part was embedded individually in Optimal Cutting Temperature (OCT; WVR, Belgium) mounting medium, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. 7µm cryosections were prepared from median parts of the brain, using a Leica RM2145 cryostat, and mounted on SuperFrost Plus glass slides. At least three non-adjacent sections (100µm apart) were labeled for each mouse. Sections were first rinsed in

PBS, blocked with PBS-5% BSA-0.05% Tween 20 for 1h at room temperature, and then incubated either overnight at 4°C with rabbit anti-Iba1 antibody (1/200) (Wako, Osaka, Japan) or for 30 min. at room temperature with rabbit anti-GFAP antibody (1/200) (Dako, Les Ulis, France). Following 3 washes in PBS-0.1% BSA, sections were incubated for 30 min at room temperature with mouse anti-A $\beta$  monoclonal antibody (1/200) (BAM10; Thermo Scientific, Rockford, USA), washed 3 times, and incubated for 30 min at room temperature with Alexa488-conjugated goat anti-rabbit and Alexa594-conjugated goat anti-mouse antibodies (1/1000 each) (Life Technologies). After 3 washes, brain sections were stained with Dapi (1 $\mu$ g/ml in PBS) and coverslipped with Immu-Mount medium (ThermoShandon, Runcorn, UK). Double staining with anti-A $\beta$  plus rabbit anti-CD68 (clone FA-11, Biolegend, San Diego, USA) or rabbit anti-KHDRBS1/Sam68 (Proteintech Group Inc., Chicago, USA) was performed in the same way, except that all blocking, incubation and washing steps were carried out in the additional presence of 0.3% Triton X-100.

### ***Microscopy and image analysis***

For each mouse, three nonadjacent sections were imaged using an Olympus BX61 microscope equipped with an Olympus DP71 camera. Four random images of the cortex and one image for the hippocampus were collected at x20 magnification for each section. All sections were immunostained and imaged using the same parameters. Quantifications were carried out by post-processing images with the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Percent of specifically stained area was determined after standardized binarization of fluorescence images. For quantification of microglia recruitment towards amyloid deposits, we first delineated the proximal surrounding area for each A $\beta$  deposit, which was defined as the limit encompassing twice the radius of the deposit. Amount of Iba1 or CD68 staining within this limit, i.e. corresponding to activated microglia colocalizing with or in close proximity to A $\beta$  deposits, was determined from the binarized images. Pooled data from four to six mice/group were analyzed, corresponding to at least n > 90 deposits of each size category.

### ***Barnes Maze***

The Barnes maze is a spatial learning and memory task based on the natural preference of mice for dark closed environments over bright open areas. The maze consists of an elevated flat circular platform with twenty circular holes located equidistantly at the periphery of the platform. A hidden box located under one target hole allows the mice to escape from the

platform. Fixed visual cues are displayed on distant walls around the maze for mice orientation. The test consisted in 4 days of learning, followed by one probe assay on day 5 with the escape box being removed. Each mouse was given four trials per day during the learning phase and a single trial for the probe test. For each trial, mice were placed in an opaque start box located in the center of the maze, ensuring a random starting orientation for each trial. After being released from the start box, mice were allowed to freely explore the maze for a maximum of 300 seconds (learning phase) or 90 seconds (probe assay). Indirect light and background noise (10 kHz, 75dB) was used as a reinforcement to motivate the mice for escaping the maze. The trial was stopped when the mouse found the target hole or when the maximum duration of the trial was reached. Mice that did not find the escape box within 300 seconds of the learning trial were gently picked up and moved to the target hole, into the escape box. Mice were left in the escape box for 2 min before being returned to their home cage. The platform surface was carefully cleaned with 70% ethanol solution between each trial to remove olfactory cues. An overhead video camera and automated video tracking software (Viewer<sup>3</sup> Biobserve, St-Augustin, Germany) were used for recording and analyzing each behavior trial. Numbers of errors, accuracy, path length and escape latency to reach the target hole were monitored. Accuracy was calculated as the sum of scores assigned to each hole visited by the mouse, with a score of zero being assigned to target hole, one to adjacent holes, and so forth towards the opposite hole that was assigned the highest score of 10. Hence, the higher the score, the lower the accuracy.

### *Y Maze*

The two-trial Y maze task is based on rodents' preference for exploring novel areas over familiar ones, and has been suggested to measure several aspects of spatial working memory. The maze consists in three transparent plastic arms, 39×8×16 cm each, set at 120° angle relative to each other. During the first trial, mice could freely explore two arms ("start" arm and "other" arm) for 5 min, while the third ("new") arm was blocked with an opaque door. Assignment of arms was counterbalanced randomly within each experimental group to avoid any preference-related bias. Mice were then returned to their home cage for 2 min. During the second trial, mice were placed at the extremity of their start arm and allowed to explore all three arms for 2 min. The maze was carefully cleaned with 70% ethanol solution between each exploration phase to remove any olfactory cues. The Viewer3 BIOBSERVE Tracking System was used for recording and analyzing each exploration trial. Latency to reach "other arm" and "novel arm" was monitored.

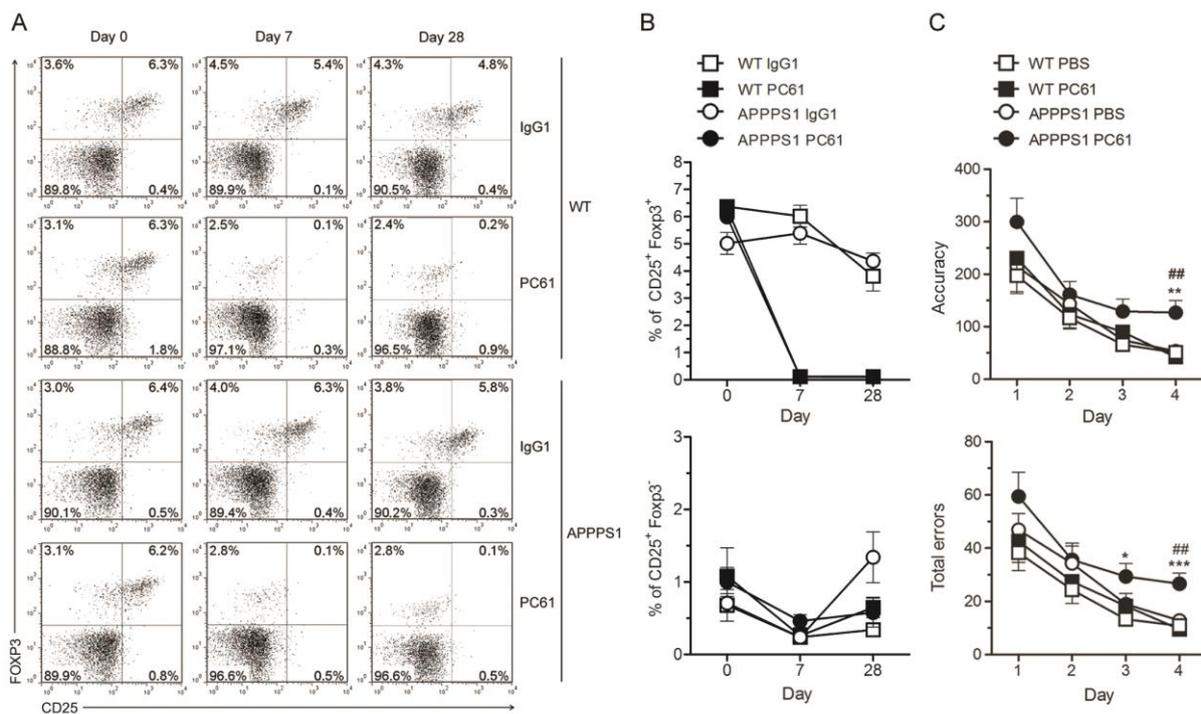
### *Statistics*

All statistical analyses were carried out using Graphpad Prism version 6.0 (San Diego, CA, USA), SPSS software (IBM, Bois-Colombes, France) and the R software for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>). Statistical tests included repeated measures ANOVA and Mann-Whitney non-parametric test. The specific tests used in each experiment are mentioned in the figure legends.

## Results

### Transient early depletion of Tregs accelerates the onset of cognitive deficits in APPPS1 mice

We analyzed the impact of Treg depletion on disease progression in APPPS1 mice, which start developing amyloid plaques at six to eight weeks of age. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs were transiently depleted at early disease stages by i.p. injection of anti-CD25 antibody (PC61) at 4-6 weeks of age, followed by a second injection four weeks later.



**Figure 1. Early depletion of Tregs accelerates the onset of cognitive deficits in APPPS1 mice.** Four- to 5-week-old APPPS1 mice and WT littermates were injected i.p. with 200 $\mu$ g of anti-CD25 antibody (PC61) and treatment was repeated 4 weeks later. Controls were injected with either PBS or 200 $\mu$ g of control IgG1 antibody. **(A-B)** Frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teffs was evaluated in the blood by flow cytometry before (d0) and after initiating the treatment (d7, d28). **(A)** Representative flow cytometry plots gated on CD4<sup>+</sup> T cells. **(B)** Percentages of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teffs among CD4<sup>+</sup> T cells. Mean  $\pm$  SEM (n = 4-7 mice/group). Data representative of 3 independent experiments. **(C)** Impact of transient Treg cell depletion on spatial learning abilities of 7-month-old WT and APPPS1 mice, using the Barnes maze test. Accuracy and total errors to reach the target hole during the learning phase are shown. Mean  $\pm$  SEM (n = 10-11 mice/group). Repeated measures ANOVA. (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs WT PBS; ## P < 0.01 vs APPPS1 PBS).

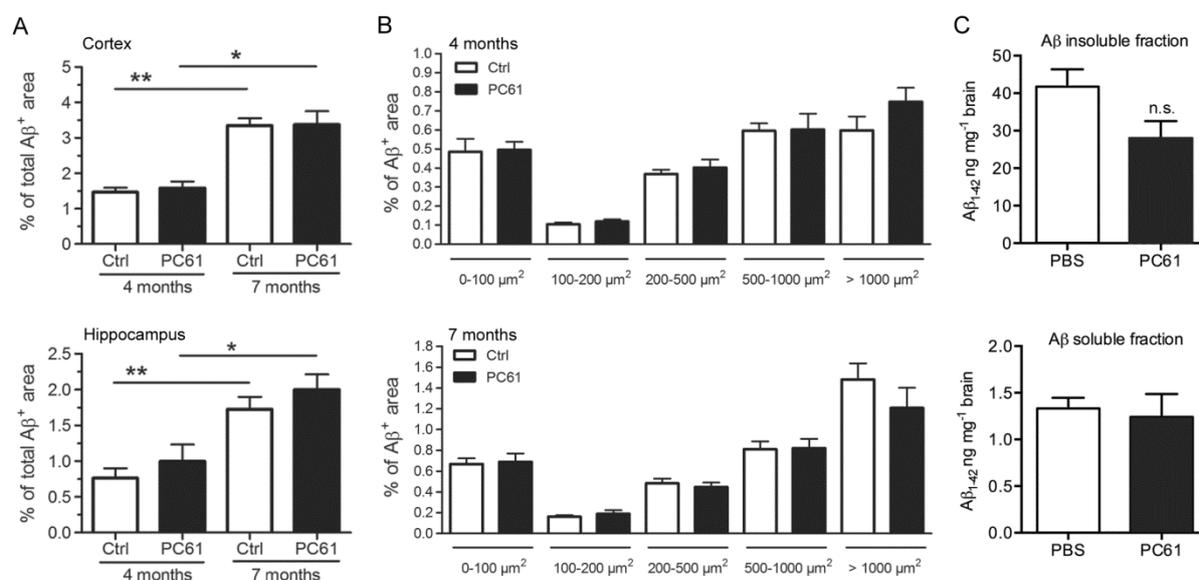
Each PC61 injection resulted in depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs for up to 28 days, whereas frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> effector T cells (Teffs) was not significantly affected (Fig. 1, A and B). The impact of early Treg depletion on the development of cognitive deficits was evaluated by the Barnes maze test at seven months of age, i.e. one month before the expected onset of cognitive decline in untreated APPPS1 mice. Whereas cognition in PBS-treated APPPS1 was not yet impaired compared to WT animals, Treg-depleted APPPS1 mice displayed altered learning abilities, with significantly less accuracy and more errors searching for the target hole (Fig. 1C). These data suggest that Tregs modulate the kinetics of disease progression in APPPS1 mice by delaying the onset of cognitive deficits.

### **Treg cell depletion does not alter A $\beta$ deposition but decreases plaque-associated microglia in APPPS1 mice**

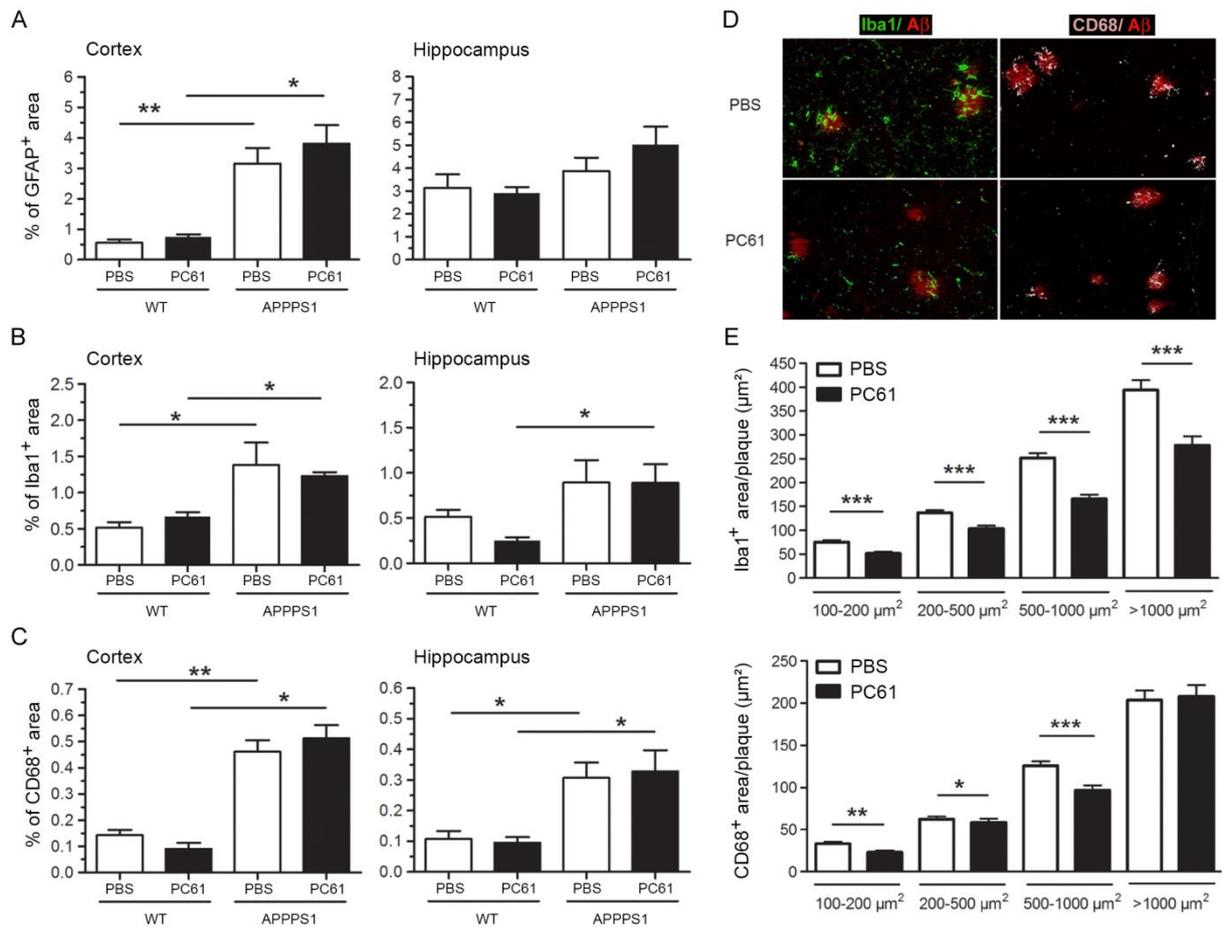
We investigated the impact of early Treg cell depletion on A $\beta$  deposition in APPPS1 mice. Whereas an increase in amyloid pathology was observed by immunohistochemistry between 4 and 7 months of age, no difference in total A $\beta$  deposition was evident in the cortex or hippocampus of Treg-depleted APPPS1 mice compared to control-treated animals (Fig. 2A). Analysis of size distribution of cortical amyloid deposits also showed similar patterns of A $\beta$  deposition in Treg-depleted and non-depleted animals (Fig. 2B). Overall burden of soluble and insoluble A $\beta$ <sub>1-42</sub> quantified by ELISA was not significantly different in the brain of Treg-depleted and non-depleted mice (Fig. 2C). These data strongly suggest that transient depletion of Tregs does not alter amyloid deposition in APPPS1 mice, neither in the form of plaques nor as soluble A $\beta$  species.

We then evaluated the impact of Treg cell depletion on microgliosis and astrocytosis that are associated with disease progression in APPPS1 mice. Quantification of GFAP-stained surface area showed a significant astrocytosis in the brain of PBS-treated APPPS1 mice as compared to WT littermates. Early Treg cell depletion did not alter the extent of GFAP staining in the cortex and hippocampus, neither in APPPS1 nor WT mice (Fig. 3A). To evaluate overall microgliosis we first quantified the global brain areas reactive for Iba1 immunostaining. Enhanced Iba1 expression was observed in the cortex and hippocampus of PBS-treated APPPS1 mice as compared to WT littermates. Treg cell depletion also did not alter the extent of Iba1 staining in the brain of APPPS1 and WT mice (Fig. 3B). Similar results were obtained when analyzing the expression of microglial activation marker CD68

(Fig. 3C). To further investigate microglia activation and behavior, we then evaluated the recruitment of activated microglia towards amyloid plaques by quantifying Iba1 or CD68 staining proximal to amyloid plaques by quantifying Iba1 or CD68 staining proximal to amyloid deposits. Although the amount of Iba1 staining colocalizing with or in close vicinity of A $\beta$  plaques gradually increases with the size range of A $\beta$  deposits in the cortex of both treated and non-treated APPS1 mice, plaque-associated Iba1 immunoreactivity was markedly decreased in Treg-depleted APPS1 as compared to non-depleted mice. Recruitment of CD68<sup>+</sup> microglia towards A $\beta$  deposits was also significantly decreased by Treg cell depletion (Fig. 3, D and E). Collectively, these data suggest that Treg cell depletion does not alter the overall magnitude of microgliosis or astrocytosis, but significantly reduces the recruitment of activated microglia towards amyloid deposits.



**Figure 2. Treg cell depletion does not alter A $\beta$  deposition in the brain of APPS1 mice.** (A-B) Immunohistochemistry analysis of A $\beta$  deposition at 4 and 7 months of age in the brain of Treg-depleted or control-treated APPS1 mice. (A) Percentage of area covered by A $\beta$  in the cortex and hippocampus. (B) Quantification of cortical A $\beta$  deposits of different size ranges (0-100; 100-200; 200-500; 500-1000; >1000  $\mu$ m<sup>2</sup>). (C) Brain levels of A $\beta$ <sub>42</sub> quantified by ELISA in formic acid-treated insoluble and DEA-soluble fractions at 4 months of age. Mean  $\pm$  SEM (n = 4-6 mice/group). Data representative of 2 independent experiments. Mann-Whitney test (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01).



**Figure 3. Early depletion of Tregs reduces plaque-associated microglia.** (A-C) Overall extent of astrocytosis, microgliosis, and microglia activation in the cortex and hippocampus of Treg-depleted or non-depleted APPPS1 and WT mice, measured by immunoreactivity to GFAP (A), Iba1 (B) and CD68 (C) at 4 months of age, respectively. Mean  $\pm$  SEM (n = 4-6 mice/group). (D-E) Microglia recruitment towards A $\beta$  plaques. Representative images (D) and quantification (E) of Iba1 and CD68 immunoreactivity colocalized with or in close vicinity of cortical A $\beta$  deposits of different size ranges. Mean  $\pm$  SEM (n > 90 plaques for each size category; from 4-6 mice/group). Data representative of 2 independent experiments. Mann-Whitney test (\*P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001).

### Treg cell depletion alters disease-related gene expression profile in the brain of APPPS1 mice

To gain a broader understanding of the impact of Tregs on disease pathophysiology, we performed gene array analysis. We first compared brain transcriptome of untreated WT and APPPS1, which identified a set of 668 genes specifically associated with APPPS1 condition. Such disease-related gene expression profile comprises 387 up-regulated and 281 down-regulated probes in APPPS1 mice (Fig. 4A and Supplementary Fig. 1A-C). Up-regulated transcripts included genes related to astrogliosis, microgliosis and neuroinflammation (*GFAP*,

*AIF1(Iba1)*, *CD68*, *TREM2*, *TYROBP*, *TSPO*, *TLR2*, *NAIP5*, *CCL3*, *CCL4*, *CCL6*, *C1qb*, *C1qc*, *C4a*, *C4b*, *Fcgr2b*, *Cathepsin S*, *MPEG1*, *CFS1R*, *CFS3R*) as well as genes related to type I interferon (IFN) response (*Ifit2*, *Ifit3*, *Ifitm1*, *Ifitm3*). Down-regulated genes included receptors for neurotransmitter, neuropeptide and neurotrophic factors (*GABBR1*, *GABRG2*, *NTSR1*, *NGFR*), regulators of neuronal activity and plasticity (*CAMKK2*, *FKBP1B*, *KHDRBS1 (Sam68)*), regulators of dendrite development and synapse maturation (*EphA5*, *EphA7*) and regulators of endocytosis and intracellular vesicle trafficking (*Caveolin-2*, *Rab3b*, *Rab5a*, *Rab6*, *Rab33a*) (Fig. 4A). Using Ingenuity's pathway analysis of downstream effects, we interrogated the APPPS1 vs WT gene expression pattern with respect to cellular functions. APPPS1 mice showed up-regulation of functions mostly associated with migration, recruitment, activation and differentiation of myeloid cells and mononuclear phagocytes, i.e. microglia and/or macrophages. Functions associated with recruitment, viability and activation of lymphocytes and neutrophils were similarly up-regulated. Additional functions related to developmental delay, lipid and glucose metabolism, and protein catabolism also tend to be up-regulated (Supplementary Fig. 2). Conversely, processes related to nervous system development and functions (development of dendritic spines, regeneration of neurites), behavior (conditioning, spatial learning, cognition), organization of cytoplasm and cytoskeleton, and cell death and survival tended to be down-regulated (Supplementary Fig. 2). In parallel, comparison of the transcriptome from Treg-depleted and non-depleted APPPS1 mice identified 580 probes that were differentially expressed in the brain of APPPS1 animals after Treg cell depletion. Comparative analysis of the two gene expression profiles, i.e. 668 genes associated with APPPS1 condition and 580 genes associated with depletion of Tregs within APPPS1 mice, was then carried out for identifying overlapping genes. This highlighted a series of 54 disease-related genes, the expression of which was differentially modulated upon Treg cell depletion (Fig. 4B and 4C). Based on Ingenuity IPA analysis, these genes were associated with multiple processes, including behavior, nervous system development and functions, cardiovascular system development and functions, inflammatory and cell-mediated immune responses, nucleic acid metabolism, gene expression regulation, lipid metabolism, carbohydrate metabolism, protein synthesis and modification, cell cycle regulation, cell death and survival (Supplementary Fig. 3). Treg cell depletion strengthened the pathological expression profile of 11 disease-related genes that were either further up-regulated (group I) or down-regulated (group III) in the absence of Tregs, suggesting that Tregs may restrain several disease-promoting mechanisms. Among group I, *Syngr1* codes for the synaptic vesicle protein synaptogyrin 1, which plays an essential role in synaptic plasticity (Janz *et al.*, 1999).

*KHDRBS1/Sam68* (group III) encodes a key regulator of neuronal activity-dependent alternative splicing, a process playing a central role in circuit assembly and plasticity processes in the brain (Iijima *et al.*, 2011). Microarray analysis suggests that deregulated expression of *Syng1* and *KHDRBS1/Sam68* observed in APPPS1 mice was further accentuated upon Treg depletion. Although no significant differences in the expression of *KHDRBS1/Sam68* (group III) protein could be detected by immunohistochemistry in the hippocampus of WT and APPPS1 mice, expression was significantly decreased in Treg-depleted APPPS1 mice, in line with microarray data (Fig. 4D). Thus, Tregs activity may contribute to mitigate alteration of synaptic plasticity in Alzheimer's disease. Groups II and IV comprise 43 disease-related genes whose pathological expression profile was reverted or normalized upon Treg cell depletion, suggesting a detrimental impact of Tregs in several disease-promoting processes. *Frzb* and *Lrp6* (group II) are key components of the Wnt/ $\beta$ -catenin canonical pathway, which modulates assembly and function of glutamatergic synapse, as well as positively regulates neurogenesis (Inestrosa and Varela-Nallar, 2014). Expression of *Frzb* and *Lrp6* was down-regulated in APPPS1 mice, reminiscent of Wnt pathway alterations observed in Alzheimer's disease (Inestrosa and Varela-Nallar, 2014), but was reverted in Treg-depleted mice. *Foxo1* and *Prl* (group IV) encode other multifunctional factors that modulate numerous functions and pathways including cell differentiation, stress resistance, metabolism, neurogenesis, proliferation, apoptosis, and vascular functions. Real time qPCR analysis confirmed that pathological expression profile of *Prl* was reverted in Treg-depleted mice (Fig. 4E). Thus, Tregs may promote alteration of multifunctional pathways that contribute to disease progression through impaired regulation of synaptic function, cell differentiation and vascular function. Importantly, reversion of pathology-associated pattern in groups II and IV may also be detrimental, such as for *Ifnar2* coding for type I IFN receptor. Type I IFN response at the choroid plexus (CP) was recently shown to negatively affect cognitive functions and hippocampal neurogenesis (Baruch *et al.*, 2014). Disease-related gene expression profile showed active type I interferon response in APPPS1 mice, evidenced by expression of *Ifit* and *Ifitms* genes, despite partial down-regulation of *Ifnar2* (Fig. 4A). Reversion towards *Ifnar2* up-regulation upon Treg cell depletion may thus be detrimental, suggestive of a possible beneficial inhibitory effect of Tregs on type I interferon response at the CP. Finally, *Il1rl2* (group II), the expression of which is reverted from down-regulated in APPPS1 mice to up-regulated upon Treg cell depletion, codes for IL-36R that displays a particular functional regulation pattern in the brain. It is specifically expressed by microglia and astrocytes, and may contribute to modulate their function

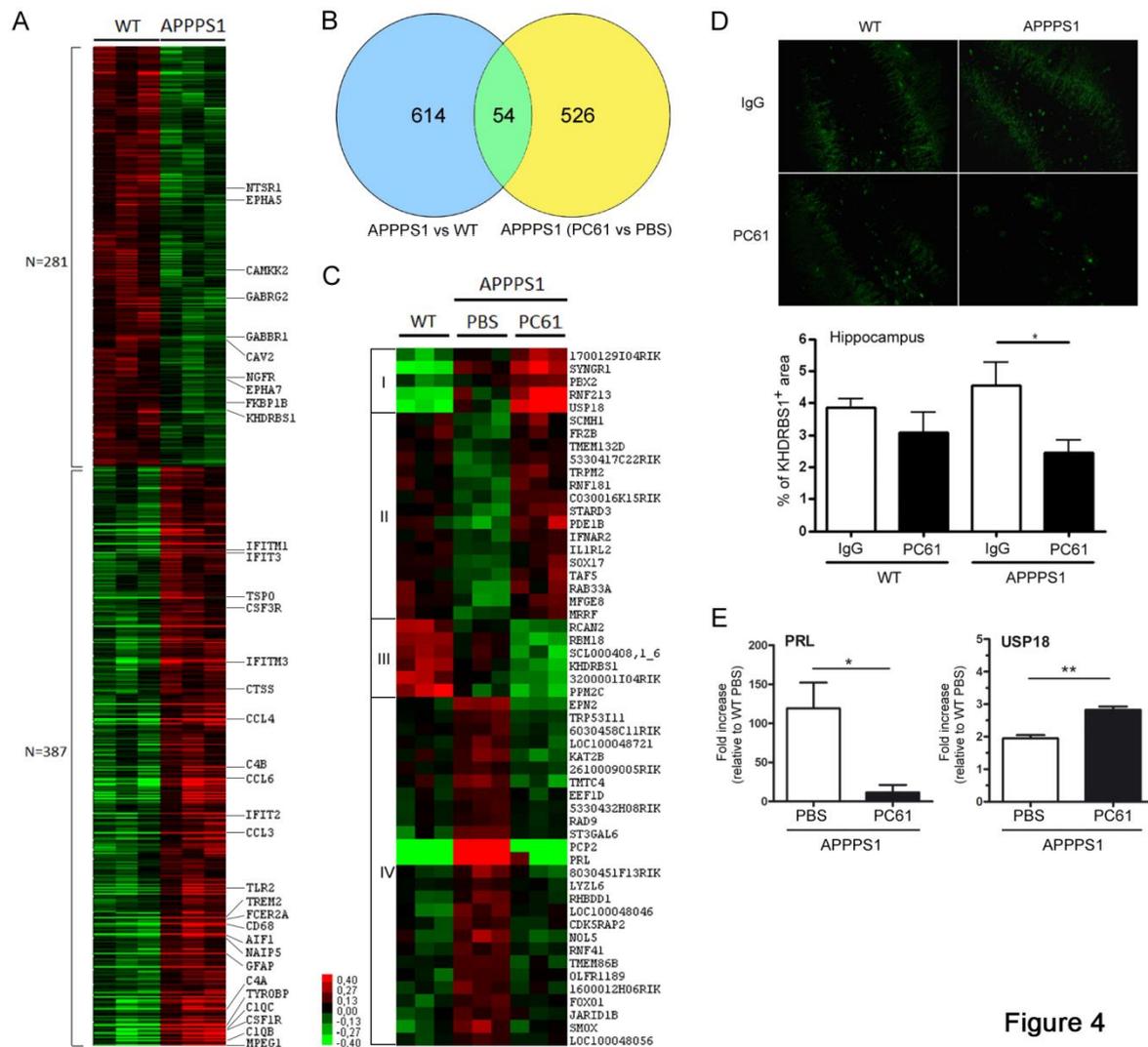


Figure 4

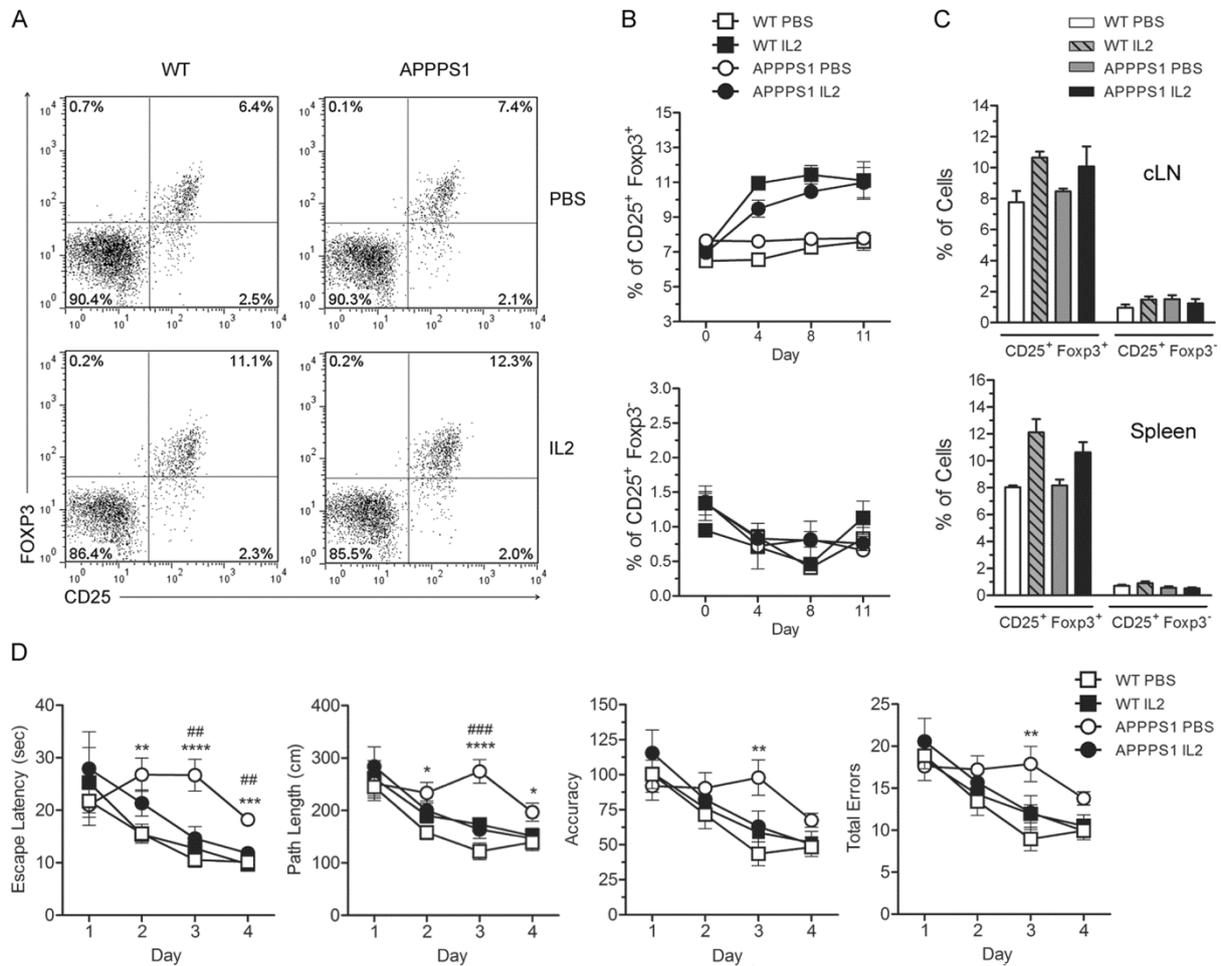
**Figure 4. Depletion of Tregs alters disease-related gene expression profile in the brain of APPS1 mice.** (A) Heatmap of differentially expressed genes in the brain of PBS-treated APPS1 as compared to WT mice. Each column represents one mouse and each row an individual probe. Genes representative of up-regulated and down-regulated functions are indicated. (B) Venn diagram identifying disease-related genes differentially modulated upon depletion of Tregs. Blue circle represents 668 disease-related probes (APPS1 vs WT) and yellow circle shows 580 treatment-related probes (PC61- vs PBS-treated APPS1). Green intersection reveals 54 disease-related genes differentially modulated by PC61 treatment. (C) Heatmap showing the expression profile of 54 disease-related genes differentially modulated upon Treg cell depletion. Each column represents one mouse and each row corresponds to one gene. For all gene array analyses, only genes with significant P-values  $\leq 0.05$  and with modulations significantly different and above the background noise modulations ( $2 \times SD$ ) are represented. Relative abundance of transcripts is indicated according to color scale. (D) Representative images and quantification of KHDRBS1/Sam68 immunoreactivity in the hippocampus of Treg-depleted or non-depleted WT and APPS1 mice. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$  mice/group). Mann-Whitney test ( $*P < 0.05$ ). (E) Relative quantification by real time qPCR of Prl and Usp18 mRNA expression in the brain of Treg-depleted and non-depleted APPS1 mice. Data are expressed as fold increase relative to untreated WT mice. Unpaired Student's t test ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ).

(Boraschi and Tagliabue, 2013). Similarly, *Usp18* has recently been identified as a critical negative regulator of microglia activation through the type I IFN pathway (Goldmann *et al.*, 2015). Microarray data suggest that APPPS1-associated up-regulation of *Usp18* was further enhanced in Treg-depleted mice, which was also confirmed by real time qPCR (Fig. 4E). Thus, the change in expression profile of *Il1rl2* and *Usp18* in APPPS1 mice upon Treg cell depletion may reflect a shift in the functionality of microglial cells, reminiscent of altered microglia recruitment in Treg-depleted mice. Taken together, these data suggest that the activity of Tregs modulates, either directly or through indirect downstream effects, multiple disease-related processes that may influence disease progression in a detrimental or beneficial way.

### **Low-dose IL-2 treatment selectively enhances Treg cell frequency and restores cognitive functions in APPPS1 mice**

Our depletion studies suggest that Treg cells play a beneficial role in the pathophysiology of Alzheimer-like pathology and delay disease progression in APPPS1 mice. We therefore investigated the impact of low-dose IL-2 treatment, which was recently described as an efficient strategy for selectively enhancing Treg responses in several pathologies associated with deregulation of Tregs (Grinberg-Bleyer *et al.*, 2010; Koreth *et al.*, 2011; Saadoun *et al.*, 2011; Hartemann *et al.*, 2013; Pilon *et al.*, 2014). WT and APPPS1 mice received daily i.p. injections of either PBS or low doses (50,000 IU/mice/day) of recombinant IL-2 for 10 days, starting at six weeks of age, i.e. the age of onset of A $\beta$  deposition in this model. Flow cytometry analyses carried out before and 4, 8 and 11 days after the first IL-2 injection revealed enhanced frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in the blood of IL-2-treated WT and APPPS1 mice (Fig. 5, A and B). A similar increase in Tregs was also observed in spleen and cervical lymph nodes (cLNs) after treatment completion (Fig. 5C). In contrast, low-dose IL-2 treatment did not significantly alter the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tregs in the blood, spleen, or cervical lymph nodes (cLNs) (Fig. 5, A-C). No difference in the total frequency of CD8<sup>+</sup> T cells was observed in IL-2-treated mice, and only a non-significant increase in rare CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell populations was noticed in the spleen, but neither in the blood nor in cLNs, of APPPS1 but not WT mice (Supplementary Fig. 4, A-D). No difference in the percentages of CD19<sup>+</sup> B cells and NK1.1<sup>+</sup> NK cells was observed (Supplementary Fig. 4E). Thus, low-dose IL-2 treatment selectively enhances the frequency of Tregs in both WT

and APPS1 mice, without significantly altering CD4<sup>+</sup> Teffs nor other major immune effectors.



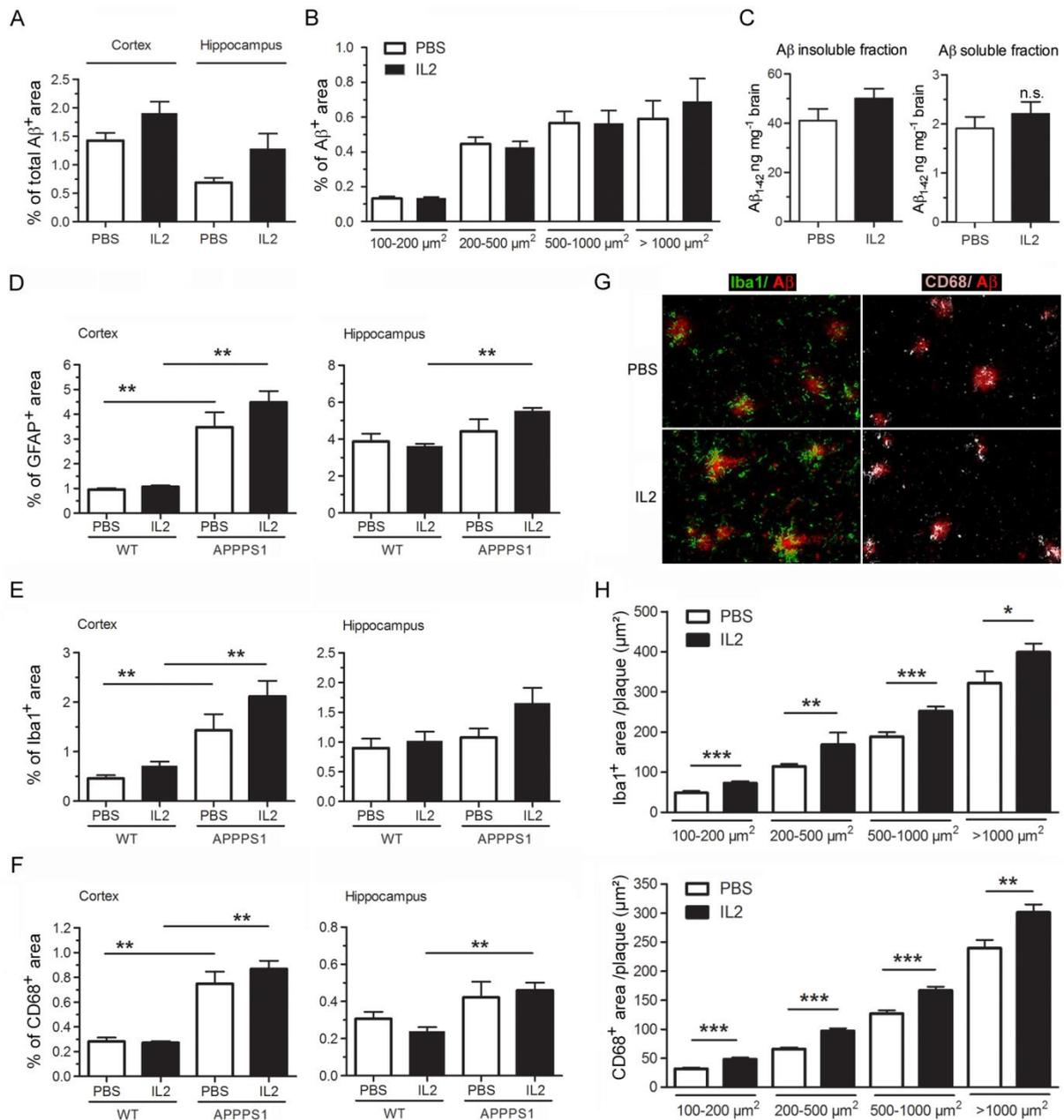
**Figure 5. Low-dose IL-2 treatment selectively amplifies Tregs and restores cognitive functions in APPS1 mice.** Six-weeks-old WT and APPS1 mice were injected daily i.p. with PBS or 50,000 IU of rhIL-2 for 10 days. Daily treatments for 5 days were repeated every 3 weeks. **(A-C)** Frequency of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs and CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Teffs among TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells was analyzed by flow cytometry. **(A)** Representative dot plots from blood at d11 of IL-2 treatment. **(B)** Quantification of Tregs and Teffs in the blood before and after 4, 8 and 11 days of treatment. **(C)** Quantification in spleen and cervical LNs (d11). Mean ± SEM (n = 3-4 mice/group). Data representative of 2 independent experiments. **(D)** Impact of IL-2 treatment on spatial learning abilities of 10-month-old WT and APPS1 mice, using the Barnes maze test. Latency, path length, accuracy, and total errors to reach the target hole during the learning phase are shown. Mean ± SEM (n = 10-12 mice/group). Repeated measures ANOVA. (\*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001 vs. WT PBS; ## P < 0.01 vs. APPS1 PBS).

The impact of low-dose IL-2 treatment on disease progression was evaluated in chronically IL-2-treated mice. In addition to the initial 10 days of treatment, mice further received daily injections of low-dose IL-2 for 5 days every three weeks. Cognitive functions

were evaluated at 10 months of age. In the Barnes maze test, PBS-treated APPPS1 mice showed significant impairment in spatial learning compared to PBS-treated WT mice, evidenced by less accuracy, more errors, higher latency and increased path length to reach the target hole. In contrast, no impairment in learning abilities was observed in IL-2-treated APPPS1 mice that behaved similarly to IL-2-treated and untreated WT animals (Fig. 5D). Of note, no significant effect of low-dose IL-2 could be detected in APPPS1 mice transiently treated with IL-2 for the first 10 days of treatment only (Supplementary Fig. 5A). Using the Y maze test, tendency to beneficial impact of IL-2 treatment on cognitive functions was suggested in both chronically or acutely treated mice (Supplementary Fig. 5B). Thus, chronic low-dose IL-2 administration restored cognitive functions in a model of Alzheimer-like pathology.

### **Low-dose IL-2 treatment enhances plaque-associated microglia**

We then investigated the impact of chronic low-dose IL-2 treatment on A $\beta$  deposition, astrocytosis and microgliosis. A slight non-significant increase in total A $\beta$  deposition was observed by immunohistochemistry in the cortex and hippocampus of IL-2-treated APPPS1 mice as compared to control-treated animals (Fig. 6A). Analysis of size distribution of A $\beta$  deposits showed similar patterns in the cortex of PBS- or IL-2-treated mice (Fig. 6B). Total load of soluble and insoluble A $\beta$ <sub>1-42</sub> measured by ELISA was also not different in the brain of IL-2- or PBS-treated mice (Fig. 6C). Similarly to A $\beta$  deposition, IL-2 treatment slightly but non-significantly increased the overall extent of astrocytosis and microgliosis in APPPS1 mice, as measured by GFAP and Iba1 expression respectively. No effect was observed in WT mice (Fig. 6, D and E). No difference in the expression of microglial activation marker CD68 was observed in the brain of IL-2-treated as compared to PBS-treated mice, either WT or APPPS1 (Fig. 6F). Nevertheless, conversely to Treg depletion, low-dose IL-2 treatment resulted in a significant increase in plaque-associated Iba1<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells (Fig. 6, G and H). Similar results were obtained when mice received transient instead of chronic IL-2 treatment (Supplementary Fig. 6). Thus, low-dose IL-2 treatment resulted in enhanced microglia recruitment towards A $\beta$  deposits.



**Figure 6. Low-dose IL-2 treatment increases plaque-associated microglia.** (A) Aβ deposition in the cortex and hippocampus of IL-2- or PBS-treated APPPS1 mice was measured at 4 months of age by immunohistochemistry. (B) Quantification of cortical Aβ deposits of different size ranges (100-200; 200-500; 500-1000; >1000 μm<sup>2</sup>). (C) Brain levels of Aβ were quantified in formic acid-treated insoluble and DEA-soluble fractions by ELISA. (D-F) Overall extent of astrocytosis, microgliosis, and microglia activation was measured by immunoreactivity to GFAP (D), Iba1 (E) and CD68 (F), respectively. Mean ± SEM (n = 4-6 mice/group). (G-H) Microglia recruitment towards Aβ plaques. Representative images (G) and quantification (H) of Iba1 and CD68 immunoreactivity colocalized with or in close vicinity of cortical Aβ deposits of different size ranges. Mean ± SEM (n > 90 plaques for each size category; from 4-6 mice/group). Data representative of 2 independent experiments. Mann-Whitney test (\*P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001).

## Discussion

Our study suggests that Tregs play a beneficial role during disease development in a mouse model of Alzheimer-like pathology. Transient depletion of Tregs accelerated the onset of cognitive decline in APPPS1 mice, whereas their amplification resulted in improved learning capacities. Tregs impacted on cognitive functions without altering A $\beta$  deposition, but at least in part by modulating microglial response. While overall microgliosis was not significantly affected, depletion of Tregs reduced the recruitment of microglia towards amyloid deposits, whereas their amplification conversely enhanced plaque-associated microglia. Still, neither depletion nor amplification of Tregs impacted on amyloid pathology.

Our results suggest that at least part of the beneficial effect of Tregs we documented is mediated by microglia independently of their A $\beta$ -clearing effect. In addition to their phagocytic activity, microglia are known to display multiple other effector functions. They can produce neurotrophic factors and/or inflammatory mediators, regulate neuronal activity by microglia/astrocyte/synapse interactions, as well as contribute to plasticity and synaptic remodeling (Salter and Beggs, 2014). Such functionalities may all contribute to modulate cognitive functions independently of A $\beta$  phagocytosis. Accordingly, recent reports in amyloid-transgenic mice showed that potential microglia-derived factors such as BDNF could reverse synapse loss, partially normalize aberrant gene expression, improve cell signaling and restore learning and memory, independently of effects on amyloid deposition (Nagahara *et al.*, 2009). Thus, modulation of selective microglial functions by Treg activity may impact on Alzheimer-related cognitive deficits without altering amyloid clearance. Of note, discrepancies or even inverse correlations between A $\beta$  deposition and cognitive deficits have been described in different murine models of amyloid pathology, suggesting that deficits may rather be related to some diffusible A $\beta$  species or even intracellular A $\beta$  (Duyckaerts *et al.*, 2008). Since detailed biochemical characterization of various A $\beta$  species was not carried out in our study, we cannot rule out that Treg-mediated effects may also partially relate to altered phagocytic activity of microglia, translating into altered amounts or ratios of given A $\beta$  sub-species. Nevertheless, our microarray studies suggest that differential recruitment of Iba1<sup>+</sup> cells towards amyloid deposits may reflect a shift in the functionality of resident microglia and/or infiltrating macrophages. Treg depletion in APPPS1 mice modified the expression profile of *Il1rl2*, which is specifically expressed by microglia and astrocytes in the brain, and may modulate their function (Boraschi and Tagliabue, 2013). Similarly, early depletion of

Tregs enhanced the expression of Ubiquitin-specific protease 18 (Usp18), a critical negative regulator of microglia activation that modulates microglia function by regulating the type I IFN receptor pathway (Goldmann *et al.*, 2015). These data are reminiscent of reduced microglia recruitment in Treg-depleted APPPS1 mice, and suggest that Tregs may contribute to promote a type I IFN-dependent beneficial activation profile of microglia in response to amyloid deposition. Despite being broadly expressed, type I IFN receptor was shown to have a unique protective role on myeloid cells for modulating autoimmune neuroinflammation in the CNS (Prinz *et al.*, 2008). Our data suggest that type I IFNs may help restraining the development of pro-inflammatory activation profile in microglia at early stages of Alzheimer's disease, thus reducing their possible contribution to impairment of cognitive functions. In the same line, recent report suggested a possible beneficial role of IFN $\beta$ 1a treatment in early Alzheimer's disease patients (Grimaldi *et al.*, 2014).

Tregs may modulate the functional differentiation of mononuclear phagocytes through direct interaction within the brain parenchyma. Tregs mediate their suppressive function through several effector mechanisms, including production of immunosuppressive cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$  and IL-35 (Sakaguchi *et al.*, 2008; Shevach, 2009). Whereas recent studies in mouse models of Alzheimer's disease evidenced that IL-10 negatively regulates A $\beta$  phagocytosis by microglia, TGF- $\beta$  has been suggested to promote or mitigate A $\beta$  clearance by microglia and peripheral macrophages, respectively (Wyss-Coray *et al.*, 2001; Town *et al.*, 2008; Chakrabarty *et al.*, 2015; Guillot-Sestier *et al.*, 2015). Although our data suggest that Tregs may contribute to restrain cognitive deficits independently of A $\beta$  clearance, further studies will be needed to better decipher the potential role of IL-10, TGF $\beta$  and other Treg effector mechanisms in Treg-mediated beneficial effect and functional modulation of microglia activity.

Alternatively, Tregs may alter the recruitment of monocyte-derived macrophages from the periphery to the CNS, fostering infiltration of cells with anti-inflammatory/suppressive activity. The choroid plexus (CP) was recently proposed as a selective and educative gate for recruitment of inflammation-resolving leukocytes to the inflamed CNS parenchyma (Schwartz and Baruch, 2014). Type I IFN response at the CP, in response to brain-derived signals, has been associated with aging-induced dysfunction of the CP and cognitive decline (Baruch *et al.*, 2014). Interestingly, our microarray studies evidenced an active type I IFN response associated with APPPS1 condition, as suggested by expression of *Ifit* and *Ifitms* genes. Thus, our data support the hypothesis that brain-derived signals associated with the

development of Alzheimer-like pathology may promote CP dysfunction through a type I IFN-dependent mechanism. However, our Treg depletion studies suggest a more complex implication of type I IFNs in the pathophysiology of Alzheimer's disease, identifying a protective role of Tregs possibly mediated in part by promoting a shift towards type I IFN-dependent beneficial activation profile of microglia. In contrast with our data, a recent report showed that transient depletion of systemic Tregs mitigates Alzheimer-like pathology, by restoring CP gateway activity in orchestrating the recruitment of inflammation-resolving leukocytes to the CNS. Authors thus concluded to systemic Treg-mediated immunosuppression as being detrimental in Alzheimer's pathology (Baruch *et al.*, 2015). These apparently conflicting results strongly underline the complex role and interplay of Tregs along the course of disease progression. Importantly, a major difference between the two studies is the stage of the disease at which Treg implication was investigated. We evidenced a beneficial role of Tregs by interfering with this immune compartment at early disease stages, when amyloid deposition and gliosis just start developing, i.e. 5-6 weeks of age in our APPPS1 model. In contrast, Baruch and colleagues modulated peripheral Tregs at an intermediate stage of Alzheimer-like pathology, i.e. 4-5 months of age in the 5XFAD model, after cerebral A $\beta$  pathology and gliosis have significantly developed. In this different pathological context, when brain-derived signals arising from amyloid deposition and gliosis have been accumulating for a prolonged period of time, authors show a detrimental impact of Tregs, acting at least in part by reducing CP ability to recruit leukocytes. Of note, their data further suggest that transient Treg depletion promotes the subsequent recruitment of immunoregulatory cells, including both monocyte-derived macrophages and Tregs, which may then play an active role in mitigating the neuroinflammatory response. Altogether, both studies are consistent with a complex and dual role of Tregs along progression of Alzheimer's pathology. At early disease stages Tregs may contribute to restrain the development of pro-inflammatory gliosis detrimental to cognitive functions, at least in part by promoting type I IFN-dependent beneficial activation profile in microglia. At later disease stages, accumulation of brain-derived signals associated with disease progression may lead to differential conditioning and responsiveness of CP to Tregs, resulting in Treg-mediated alteration of CP and impaired recruitment of inflammation-resolving leukocytes to CNS. Alleviating such CP-related detrimental impact of Tregs may allow fostering again their beneficial effect in mitigating the neuroinflammatory response. Importantly, our data strongly suggest that amplifying Tregs starting from early disease stages may profoundly restrain or even prevent the development of detrimental pro-inflammatory gliosis, and consequently the subsequent

CP responsiveness to Treg-mediated deleterious activity on leukocytes recruitment. Additional studies will be needed for further evaluating these hypothesis and better deciphering the complex interplay of type I IFN and Tregs in the context of Alzheimer's disease.

Functionality of the CP was shown to be regulated by CNS-specific T cells (Schwartz and Baruch, 2014). We previously showed that Tregs critically control the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T effs responses in Alzheimer-like pathology and in response to A $\beta$  vaccination (Toly-Ndour *et al.*, 2011). Modulation of A $\beta$ -specific T effs responses by Tregs may thus contribute to modulate the functionality of CP epithelium and shape the extent and differentiation profile of macrophages recruited from the periphery. Finally, systemic inflammation was suggested to contribute to exaggerated inflammatory response of primed microglia in neurodegeneration (Perry and Holmes, 2014). Modulation by Tregs of overall peripheral inflammatory status may also translate into differential activation and functional differentiation of parenchymal microglia. All such hypotheses are non-mutually exclusive and will need to be addressed in complementary studies.

Our gene array analyses suggest that Tregs may have both beneficial and detrimental impacts on multiple disease-related processes in Alzheimer's disease, pertaining to microglia, type I IFN response and choroid plexus, but also to neuronal activity and vascular functions. The main primary processes directly affected by Tregs, as opposed to downstream secondary effects, still remain to be determined. Nevertheless, overall balance of the effects of Tregs on disease pathophysiology appears beneficial in our study, and boosting Tregs at early disease stages via peripheral administration of low-dose IL-2 restores cognitive functions in Alzheimer-like pathology. Of note, whereas a beneficial effect of low-dose IL-2 treatment was observed for chronically treated APPPS1 mice, only a slight tendency towards improved cognition was suggested in transiently treated animals. These data suggest that transient low-dose IL-2 treatment may be sufficient for initiating Treg-mediated beneficial processes, but recurrent or sustained amplification of Tregs starting from early disease stages seems necessary for fully supporting the entire neuroprotective effect. Importantly, low-dose IL-2 treatment was shown to be clinically well tolerated and efficient at modulating Treg responses in several human pathological settings (Koreth *et al.*, 2011; Saadoun *et al.*, 2011; Hartemann *et al.*, 2013). These promising preliminary studies strongly support further clinical assessment of low-dose IL-2 treatment in inflammatory diseases, and underline the high potential for rapid translation to clinical trials (Klatzmann and Abbas, 2015). Our proof-of-concept

preclinical study in a mouse model of Alzheimer's disease suggest that such Treg-based immunomodulatory approaches may constitute innovative therapeutic and even preventive strategies for slowing cognitive decline and disease progression in Alzheimer's disease.

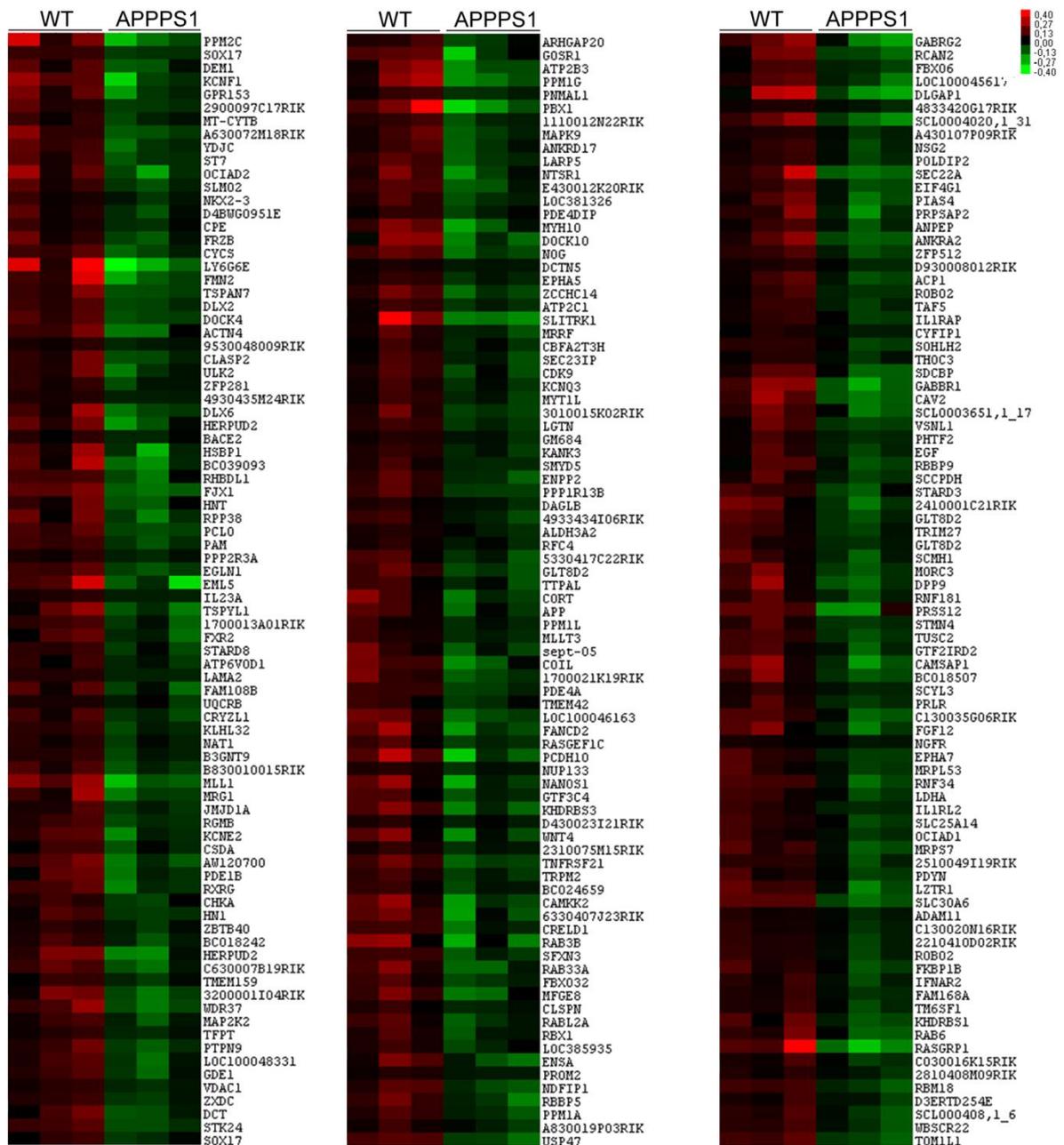
## **Acknowledgments**

We thank Benoit Delatour and Thomas Freret for expert discussions on mouse behavior experiments.

## **Funding**

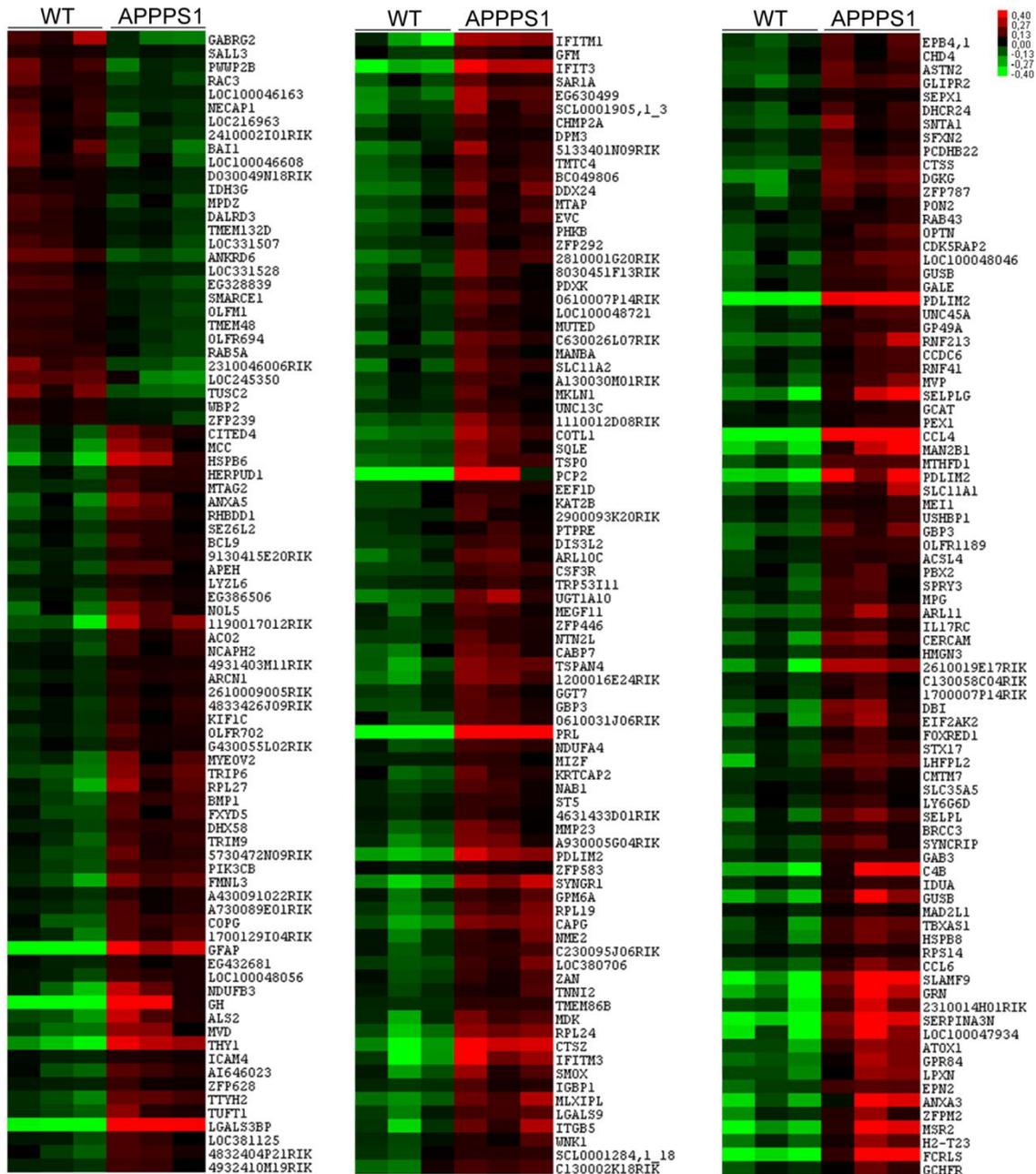
This work was supported by grants from Association France Alzheimer, Fondation de France, LECMA, Fondation Plan Alzheimer, INSERM, and Institut de Neurosciences translationnelles de Paris (IHU-A-ICM).

## Supplementary material



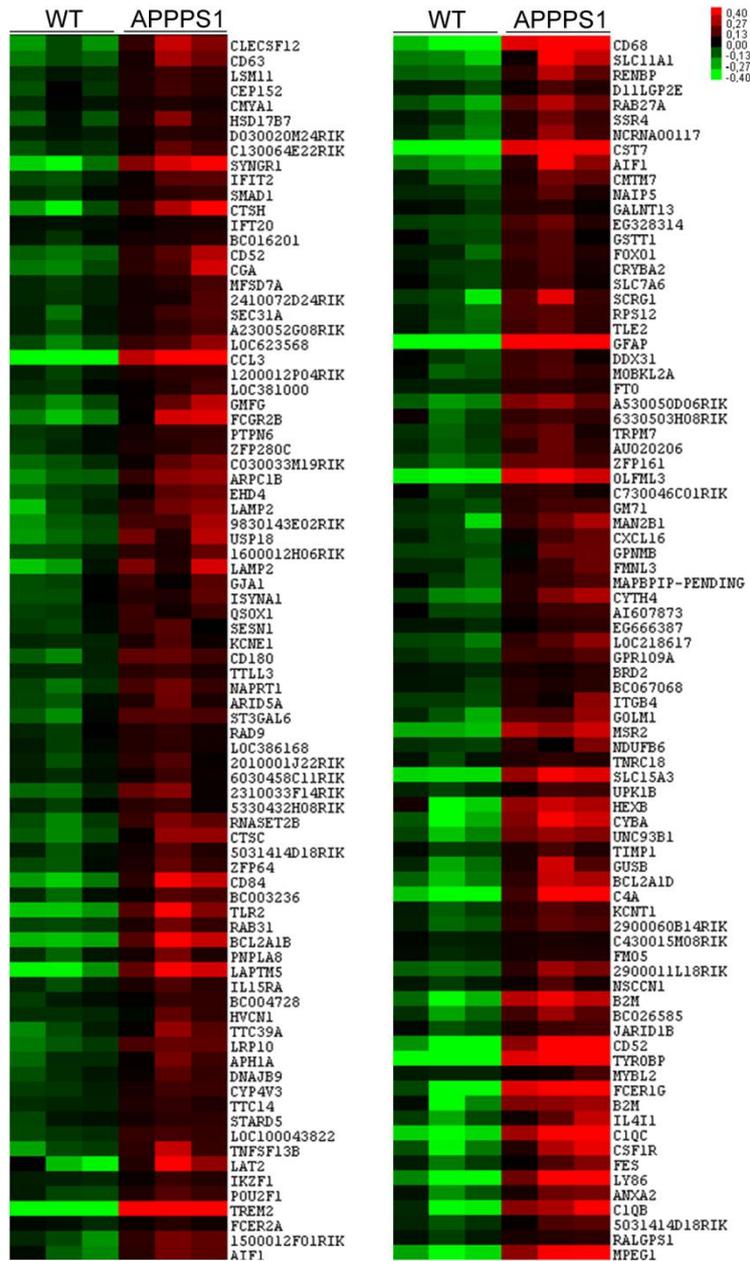
**Supplementary Fig. 1-A:** Heatmap of disease-related genes in APPS1 mice

Detailed heatmap of differentially expressed genes in the brain of PBS-treated APPS1 as compared to WT mice. Each column represents one mouse and each row an individual probe. Relative abundance of transcripts is according to color scale.



**Supplementary Fig. 1-B:** Heatmap of disease-related genes in APPPS1 mice

Detailed heatmap of differentially expressed genes in the brain of PBS-treated APPPS1 as compared to WT mice. Each column represents one mouse and each row an individual probe. Relative abundance of transcripts is according to color scale.



**Supplementary Fig. 1-C:** Heatmap of disease-related genes in APPPS1 mice

Detailed heatmap of differentially expressed genes in the brain of PBS-treated APPPS1 as compared to WT mice. Each column represents one mouse and each row an individual probe. Relative abundance of transcripts is according to color scale.

A

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Activation z-score
migration of blood cells	8.61E-06	2,580
cell viability of blood cells	4.87E-03	2,514
leukocyte migration	1.64E-05	2,489
phagocytosis	7.22E-06	2,480
prepulse inhibition	2.22E-04	2,401
recruitment of leukocytes	2.63E-04	2,301
cell movement of myeloid cells	9.50E-04	2,293
recruitment of cells	8.91E-05	2,284
cytotoxicity of cells	9.12E-03	2,238
inflammatory response	3.38E-04	2,234
cell movement of neutrophils	8.02E-03	2,198
phagocytosis of cells	7.46E-04	2,183
cell movement of phagocytes	7.16E-04	2,152
aggregation of blood platelets	5.48E-03	2,127
cell viability of leukocytes	3.36E-03	2,099
cell movement of leukocytes	8.46E-05	2,075
immune response of cells	8.71E-07	2,011
developmental delay	1.21E-03	2,000
recruitment of myeloid cells	8.25E-03	1,999
insulin-dependent diabetes mellitus	5.23E-05	1,951
migration of macrophages	3.00E-03	1,946
glucose metabolism disorder	2.46E-05	1,930
cytotoxicity of T lymphocytes	8.09E-03	1,911
systemic autoimmune syndrome	1.26E-06	1,851
activation of phagocytes	1.08E-03	1,850
release of lipid	6.03E-03	1,796
recruitment of phagocytes	8.39E-03	1,786
response of phagocytes	6.25E-03	1,757
immune response of phagocytes	6.39E-03	1,753
cell movement	2.18E-05	1,750
engulfment of cells	7.48E-05	1,746
immune response of leukocytes	8.48E-04	1,746
diabetes mellitus	9.21E-05	1,703
cell viability of phagocytes	1.96E-04	1,690
differentiation of myeloid cells	1.41E-04	1,664
activation of myeloid cells	8.50E-04	1,663
differentiation of phagocytes	3.46E-03	1,651
chemotaxis of phagocytes	1.38E-03	1,645
chemotaxis of myeloid cells	1.24E-03	1,637
binding of leukemia cell lines	1.16E-04	1,617
chemotaxis of leukocytes	6.35E-03	1,604
cell movement of peripheral blood leukocytes	5.35E-03	1,596
catabolism of protein	2.61E-03	1,595
cellular homeostasis	1.67E-05	1,580
differentiation of antigen presenting cells	7.97E-04	1,575
homing of leukocytes	1.65E-03	1,440
activation of blood cells	1.07E-05	1,436
activation of leukocytes	1.49E-05	1,425
phagocytosis of blood cells	3.98E-03	1,425
maturation of leukocytes	9.23E-03	1,419
migration of cells	6.62E-06	1,386
degranulation of cells	4.25E-03	1,352
cell viability of myeloid cells	4.48E-03	1,347

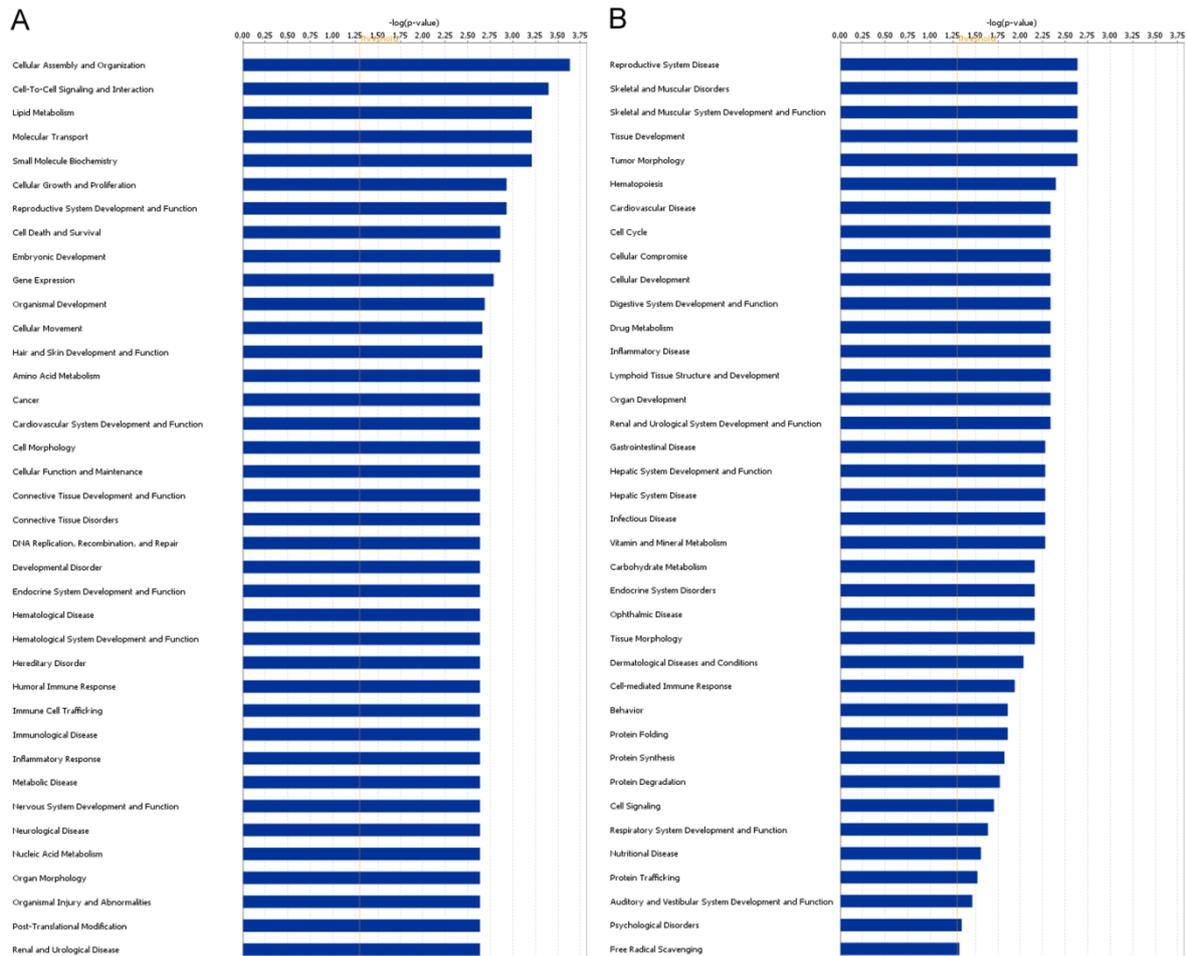
Diseases or Functions Annotation	p-Value	Activation z-score
activation of antigen presenting cells	2.92E-05	1,320
chemotaxis of neutrophils	1.77E-03	1,318
response of antigen presenting cells	1.80E-03	1,307
phagocytosis of phagocytes	4.21E-03	1,305
immune response of antigen presenting cells	2.24E-03	1,302
maturation of cells	1.35E-03	1,192
apoptosis of microvascular endothelial cells	2.84E-04	1,179
cell death of epithelial cell lines	4.04E-03	1,179
cell viability of macrophages	6.11E-04	1,177
transmigration of T lymphocytes	3.56E-03	1,172
quantity of natural killer T lymphocytes	7.37E-03	1,172
phagocytosis by macrophages	8.13E-03	1,169
cell viability of antigen presenting cells	3.05E-04	1,129
recruitment of mononuclear leukocytes	7.02E-03	1,129
degranulation of phagocytes	6.21E-04	1,114
chemotaxis of cells	7.39E-03	1,076
activation of macrophages	2.56E-03	1,061
quantity of cytokine	2.48E-05	1,047
uptake of Ca <sup>2+</sup>	5.17E-04	1,041
development of central nervous system	9.00E-03	1,040
differentiation of macrophages	7.02E-05	1,035
quantity of PRL in blood	5.92E-04	1,000
cell movement of nervous tissue cell lines	6.70E-03	1,000

B

Diseases or Functions Annotation	p-Value	Activation z-score
apoptosis	5.96E-06	-2,264
regeneration of neurons	5.42E-03	-1,964
cell death	7.60E-06	-1,785
necrosis	1.20E-03	-1,778
quantity of dendritic spines	4.97E-03	-1,732
cell death of motor neurons	8.56E-03	-1,526
branching of cells	1.75E-03	-1,483
insulinitis	6.74E-03	-1,387
development of leukocytes	7.89E-04	-1,324
conditioning	9.52E-03	-1,289
microtubule dynamics	1.34E-03	-1,275
colony formation	6.41E-03	-1,248
cell viability of nervous tissue cell lines	8.60E-03	-1,236
development of blood cells	4.92E-04	-1,220
development of hematopoietic progenitor cells	1.97E-03	-1,216
pinocytosis	4.13E-04	-1,183
organization of cytoplasm	5.08E-04	-1,165
organization of cytoskeleton	2.36E-03	-1,165
spatial learning	1.08E-04	-1,148
protein kinase cascade	7.94E-03	-1,134
gliosis of astrocytes	5.92E-04	-1,040
regeneration of cells	3.62E-03	-1,040
proliferation of T lymphocytes	9.75E-04	-1,026
development of lymphocytes	1.89E-03	-1,020
learning	2.75E-04	-1,000
regeneration of neurites	4.92E-03	-1,000
cognition	5.28E-04	-0,998

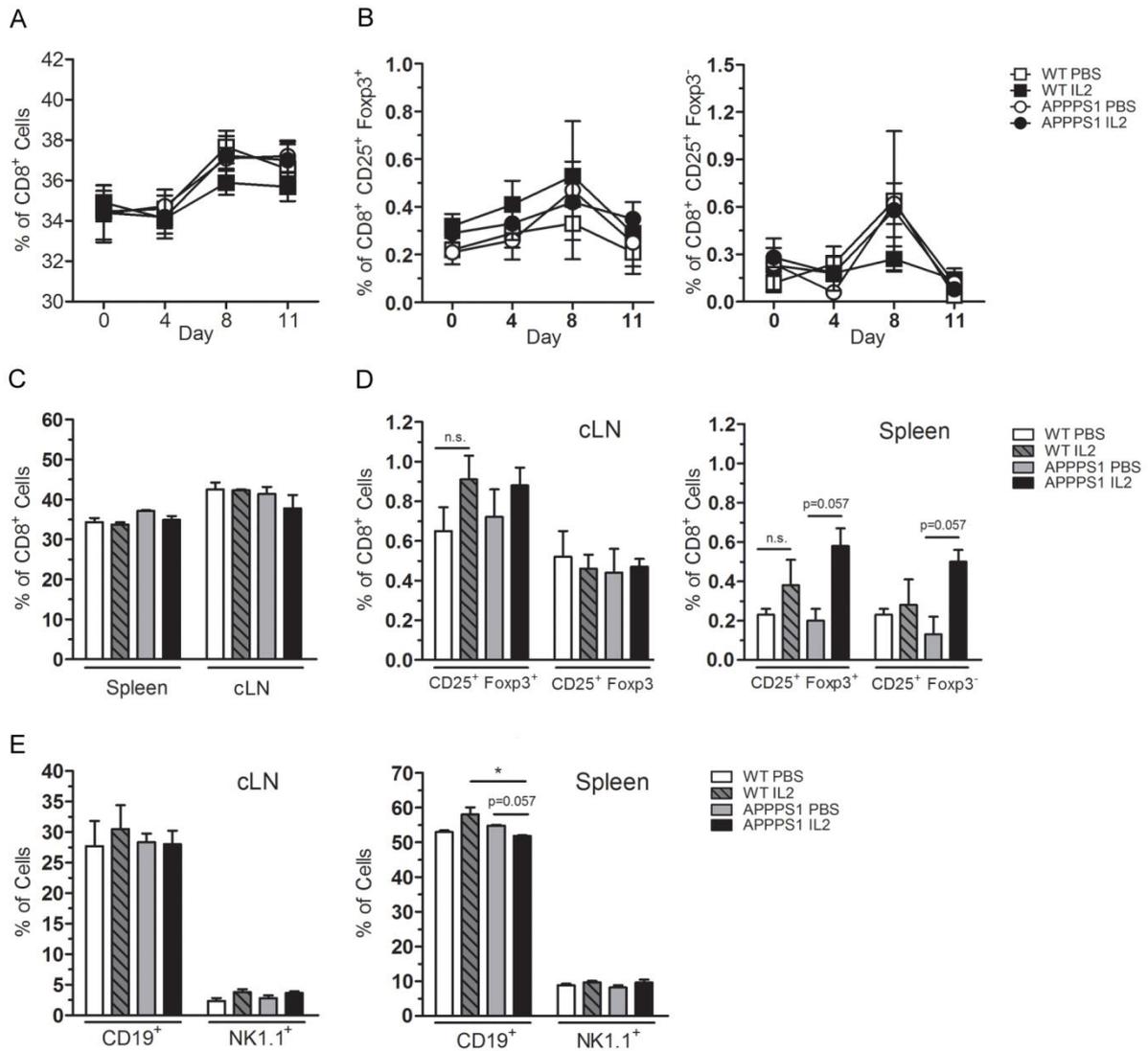
Supplementary Fig. 2: Affected functions in APPPS1 mice

Gene expression data (APPPS1 vs WT mice) were uploaded to Ingenuity Pathway Analysis, and differentially expressed probes were included in downstream effects analysis. Functions up-regulated (A) or down-regulated (B) in APPPS1 mice were sorted by z-score. Pooled samples from three mice per group.



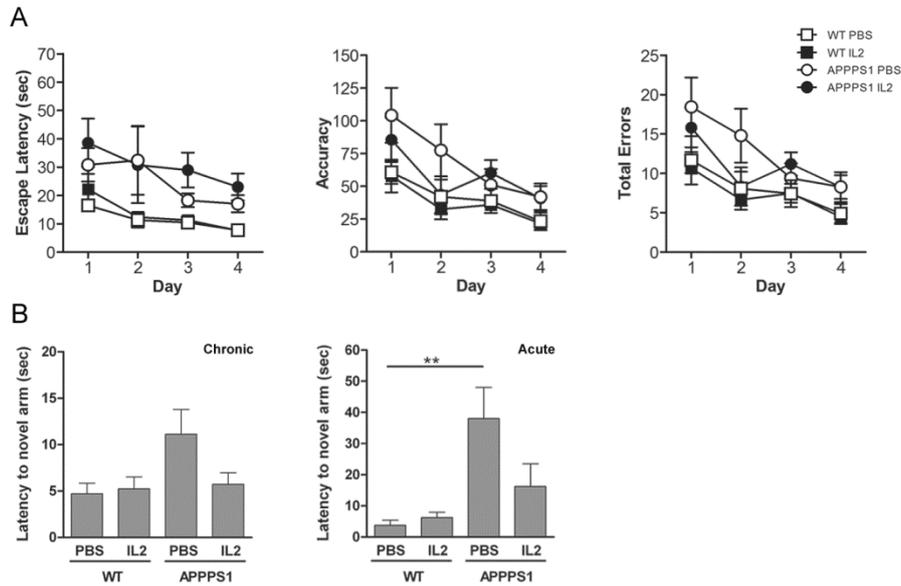
**Supplementary Fig. 3:** Functions associated with 54 disease-related genes affected by Treg cell depletion

Comparative analysis of two gene expression profiles, i.e. APPPS1 vs WT and APPPS1 (PC61 vs PBS), highlighted a series of 54 disease-related genes, the expression of which was differentially modulated upon Treg cell depletion (see Fig. 4B and 4C). Gene expression data were uploaded to Ingenuity Pathway Analysis for identifying associated functions. Significance value is expressed on the y-axis, and functions are listed from most to least significant. Pooled samples from three mice per group.



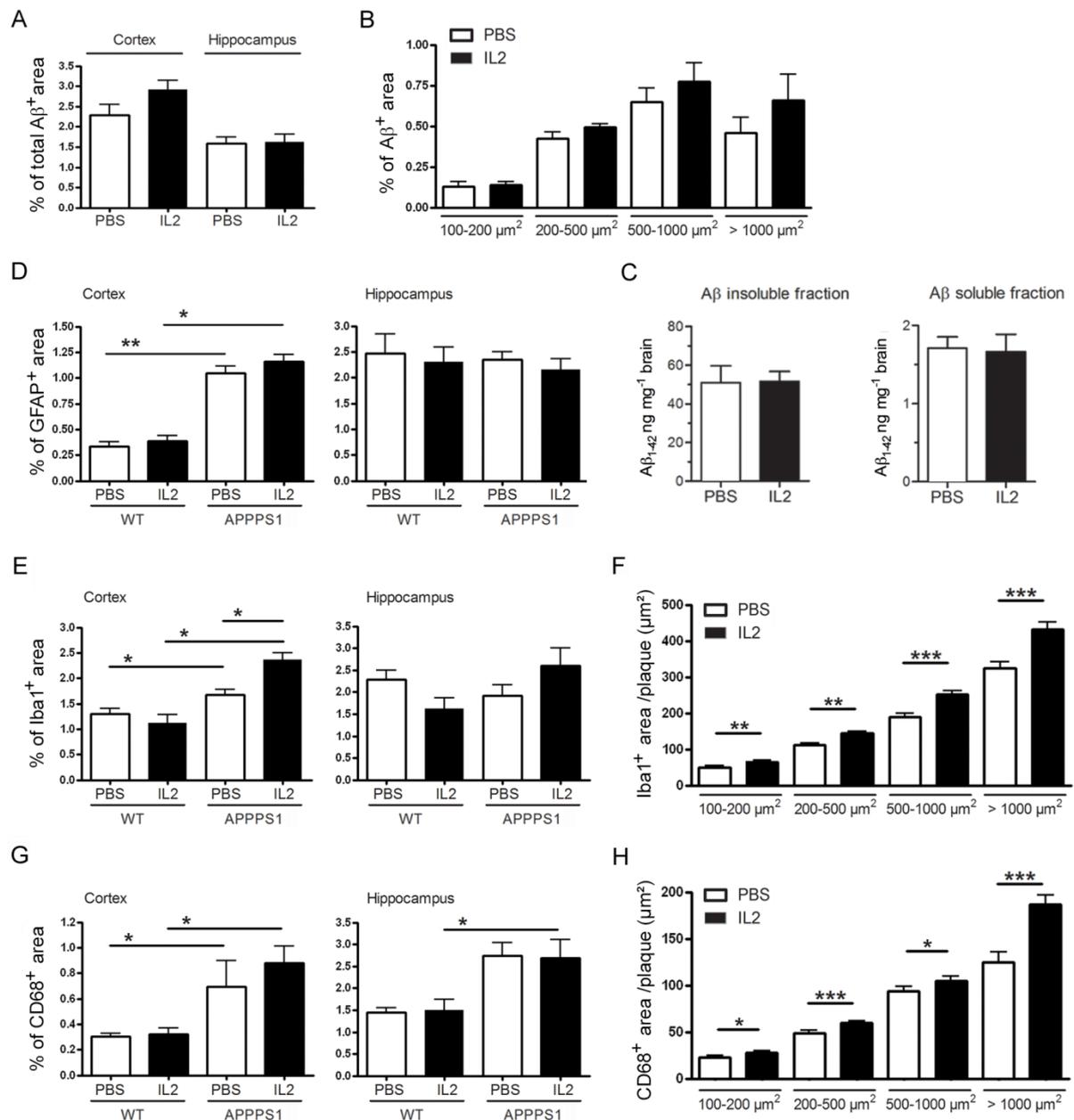
**Supplementary Fig. 4:** Impact of low-dose IL2 treatment on other immune populations

Six-weeks-old WT and APPPS1 mice were injected daily i.p. with PBS or 50,000 IU of rhIL-2 for 10 days, and impact on various immune effectors was monitored by flow cytometry. Total CD8<sup>+</sup> cells, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (Teff) and CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were quantified among TCRβ<sup>+</sup> lymphocytes in the blood before and after 4, 8 and 11 days of treatment (**A**, **B**), and in spleen and cervical LNs on day 11 (**C**, **D**). Total CD19<sup>+</sup> and NK1.1<sup>+</sup> cells among TCRβ<sup>+</sup> cells were quantified in spleen and cervical LNs on day 11 (**E**). Mean ± SEM (n = 3-4 mice/group). Data are representative of two independent experiments.



**Supplementary Fig. 5:** Impact of acute low-dose IL-2 treatment on cognitive functions in APPPS1 mice

Six-weeks-old WT and APPPS1 mice were injected daily i.p. with PBS or 50,000 IU of rhIL-2 for 10 days, and cognitive functions were evaluated at 10 months of age. **(A)** Impact of acute IL-2 treatment on spatial learning and memory assessed using the Barnes maze test. Escape latency, accuracy, and total errors to reach the target hole during the learning phase are shown. Mean  $\pm$  SEM (n = 8-11 mice/group). **(B)** Spatial memory as analyzed using the Y-maze test, after either chronic (left panel) or acute (right panel) low-dose IL-2 treatment. Mean  $\pm$  SEM (n = 7-14 mice/group). MannWhitney test (\*\* P < 0.01).



**Supplementary Fig. 6:** Acute low-dose IL-2 treatment increases plaque-associated microglia

Six-weeks-old WT and APPPS1 mice were injected daily i.p. with PBS or 50,000 IU of rhIL-2 for 10 days, and brains were harvested at 4 months of age (A) Aβ deposition in the cortex and hippocampus was measured by immunohistochemistry. (B) Quantification of cortical Aβ deposits of different size ranges (100-200; 200-500; 500-1000; >1000 μm<sup>2</sup>). (C) Brain levels of Aβ<sub>1-42</sub> were quantified in formic acid-treated insoluble and DEA-soluble fractions by ELISA. (D-F) Overall extent of astrocytosis, microgliosis, and microglia activation in the cortex and hippocampus was measured by immunoreactivity to GFAP (D), Iba1 (E) and CD68 (F), respectively. Mean ± SEM (n = 4-6 mice/group). (G-H) Microglia recruitment towards Aβ plaques. Quantification of Iba1 (G) and CD68 (H) immunoreactivity colocalized with or in close vicinity of cortical Aβ deposits of different size ranges. Mean ± SEM (n > 90 plaques for each size category; from 4-6 mice/group). Data representative of two independent experiments. MannWhitney test (\*P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001).

## References

- Baruch K, Deczkowska A, David E, Castellano JM, Miller O, Kertser A, et al. Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science* 2014; 346(6205): 89-93.
- Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Deczkowska A, Sharif AM, Spinrad A, et al. Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nature communications* 2015; 6: 7967.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2011; 134(Pt 5): 1293-314.
- Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Seminars in immunology* 2013; 25(6): 394-407.
- Cao C, Arendash GW, Dickson A, Mamcarz MB, Lin X, Ethell DW. A $\beta$ -specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol Dis* 2009; 34(1): 63-70.
- Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, Eddy JA, Funk CC, Moore B, et al. IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron* 2015; 85(3): 519-33.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica* 2008; 115(1): 5-38.
- Ethell DW, Shippy D, Cao C, Cracchiolo JR, Runfeldt M, Blake B, et al. A $\beta$ -specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol Dis* 2006; 23(2): 351-61.
- Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2004; 14(1): 11-20.
- Goldmann T, Zeller N, Raasch J, Kierdorf K, Frenzel K, Ketscher L, et al. USP18 lack in microglia causes destructive interferonopathy of the mouse brain. *The EMBO journal* 2015; 34(12): 1612-29.
- Grimaldi LM, Zappala G, Iemolo F, Castellano AE, Ruggieri S, Bruno G, et al. A pilot study on the use of interferon beta-1a in early Alzheimer's disease subjects. *Journal of neuroinflammation* 2014; 11: 30.
- Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010; 207(9): 1871-8.
- Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, Rodriguez J, Jr., Leung BP, Rezai-Zadeh K, et al. I110 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron* 2015; 85(3): 534-48.
- Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, et al. Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; 1(4): 295-305.
- Iijima T, Wu K, Witte H, Hanno-Iijima Y, Glatzer T, Richard S, et al. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell* 2011; 147(7): 1601-14.

- Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *Journal of molecular cell biology* 2014; 6(1): 64-74.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, et al. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408(6815): 979-82.
- Janz R, Sudhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 1999; 24(3): 687-700.
- Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskva V, Ivanov D, et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010; 5(11): e13950.
- Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(5): 283-94.
- Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011; 365(22): 2055-66.
- Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis* 2010; 20(4): 1107-18.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature genetics* 2013; 45(12): 1452-8.
- Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM, Schipper HM, Derhovanessian E, Goldeck D, et al. Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 17(1): 91-103.
- Monsonogo A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(13): 5048-53.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2003; 112(3): 415-22.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408(6815): 982-5.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2009; 15(3): 331-7.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003; 9(4): 448-52.
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 2003; 61(1): 46-54.
- Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(4): 217-24.
- Pilon CB, Petillon S, Naserian S, Martin GH, Badoual C, Lang P, et al. Administration of low

- doses of IL-2 combined to rapamycin promotes allogeneic skin graft survival in mice. *Am J Transplant* 2014; 14(12): 2874-82.
- Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008; 28(5): 675-86.
- Reynolds AD, Stone DK, Hutter JA, Benner EJ, Mosley RL, Gendelman HE. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol* 2010; 184(5): 2261-71.
- Rosenkranz D, Weyer S, Tolosa E, Gaenslen A, Berg D, Leyhe T, et al. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 2007; 188(1-2): 117-27.
- Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011; 365(22): 2067-77.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5): 775-87.
- Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 2014; 158(1): 15-24.
- Saresella M, Calabrese E, Marventano I, Piancone F, Gatti A, Calvo MG, et al. PD1 negative and PD1 positive CD4+ T regulatory cells in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 21(3): 927-38.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400(6740): 173-7.
- Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO journal* 2014; 33(1): 7-22.
- Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; 30(5): 636-45.
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, et al. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 2002; 124(1-2): 83-92.
- Toly-Ndour C, Lui G, Nunes MM, Bruley-Rosset M, Aucouturier P, Dorothee G. MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4+ T cell responses to amyloid-beta peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition. *J Immunol* 2011; 187(9): 4492-500.
- Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekely CA, Tan J, et al. Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nat Med* 2008; 14(6): 681-7.
- Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, et al. TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 2001; 7(5): 612-8.

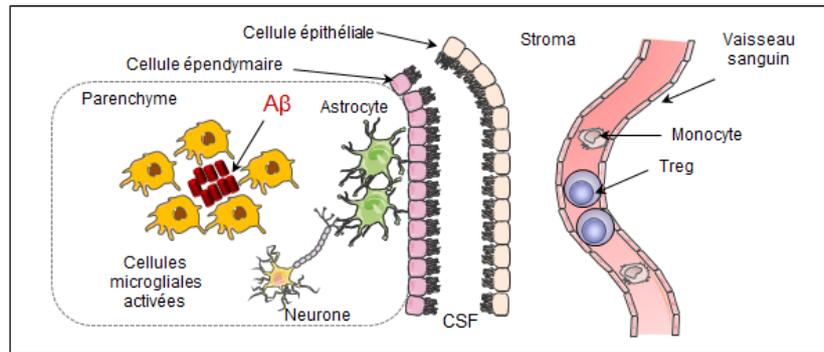
## B. Résumé des résultats

La déplétion et l'amplification des Tregs n'ont pas d'impact sur la pathologie amyloïde, sur la microgliose et l'astrogliose. En revanche, nous avons trouvé que le recrutement des cellules microgliales autour des plaques est affecté ainsi que la cinétique d'apparition des déficits cognitifs par les deux traitements. D'une part, la déplétion des Tregs par l'anti-CD25 entraîne une diminution du nombre de cellules microgliales et une accélération des troubles cognitifs. D'autre part, l'amplification des Tregs par une injection chronique d'IL2 recombinante humaine entraîne une augmentation du recrutement des cellules microgliales autour des plaques. Un récapitulatif des résultats de l'article est proposé dans le tableau ci-dessous. L'ensemble des résultats indique un effet bénéfique des Tregs sur la progression de la maladie dans le modèle murin APPS1, passant par la modulation de la fonctionnalité des cellules microgliales et leur recrutement autour des plaques.

	Cinétique traitement	Effets du traitement comparé au traitement PBS chez les souris APPS1					
		Pathologie amyloïde (IHC & ELISA)	Microgliose et Astrogliose (IHC)	Expression Gènes (Transcriptome)	Recrutement des cellules microgliales autour des plaques	Déficits cognitifs	
						Barnes-maze	Y-maze
<b>Anti-CD25 (PC61)</b>	200µg à 1 et 2 mois	Non à 4 et 7 mois	Non	Oui, l'expression de 54 gènes liés à la maladie modifiée	Oui, diminution	Oui, Accélération, déficits à 7 mois	N/A
<b>IL2 chronique</b>	5.10 <sup>4</sup> UI à 6 sem. (10jrs) et toutes les 3sem. (5 jrs)	Non à 4 mois	Non	Non	Oui, augmentation	Oui, absence de déficits à 10 mois	Non (tendance)
<b>IL2 aigu</b>	510 <sup>4</sup> UI à 6sem. (10jrs)	Non à 4 mois	Non	Non	Oui, augmentation	Non	Non (tendance)

**Récapitulatif des résultats de l'article**, l'effet des Tregs sur la pathologie amyloïde, sur la neuroinflammation et les fonctions cognitives à la suite d'une déplétion transitoire (PC61) ou une amplification (IL2) des Tregs.

Jrs : jours ; N/A : ces tests n'ont pas été réalisés pour ce traitement ; sem : semaines ; UI : unité internationale ; Barnes et Y-maze : tests utilisés pour évaluer les fonctions cognitives



↙ Déplétion

↘ Amplification

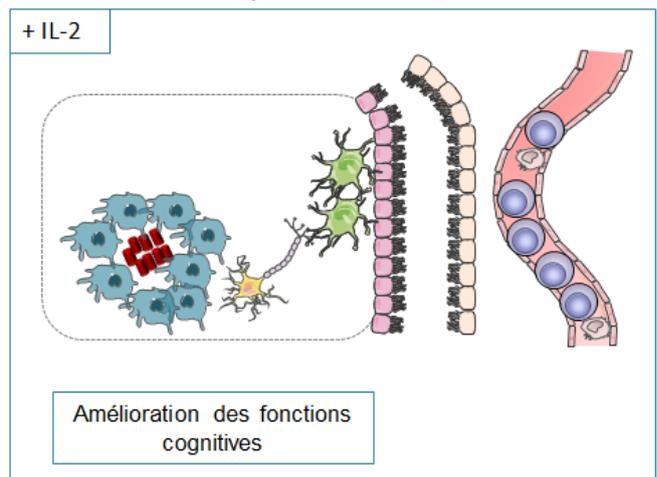
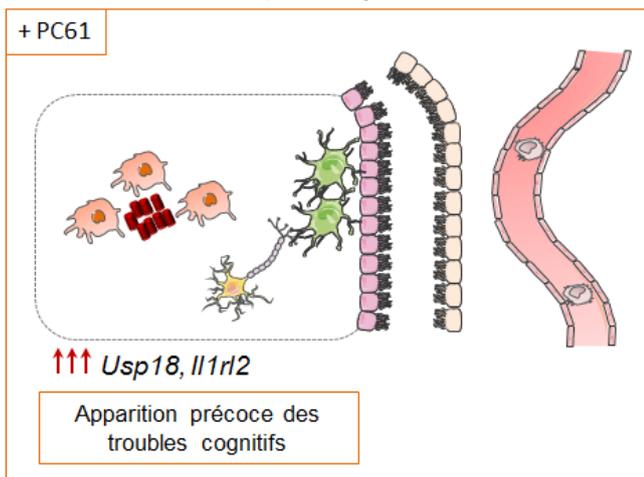


Figure 17: Résumé schématisé des résultats présentés

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mon projet de thèse a été d'analyser le rôle des Tregs dans la physiopathologie de la MA. L'ensemble de nos résultats indique que les Tregs ralentissent la progression de la maladie en modulant la fonctionnalité des cellules microgliales.

Comme dans toutes les études précliniques, il faut rester prudent dans l'interprétation des données obtenues dans les modèles d'étude et évaluer leur validité chez l'homme.

Le modèle APPPS1 utilisé dans cette étude est un modèle agressif dans lequel le dépôt des plaques séniles commence très tôt. La mutation PS1 introduite dans ce modèle, cause la maladie dès l'adolescence chez l'homme [Moehlmann *et al.* 2002]. Elle induit des dépôts amyloïdes très denses et compacts. Cela pourrait être une explication de l'absence d'effet des différents traitements sur la pathologie amyloïde. En plus de leur fonction dans le catabolisme de l'APP, les  $\gamma$ -sécrétases clivent de nombreuses autres protéines membranaires et sont donc impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires [Lleo and Saura 2011]. La mutation de la PS1 pourrait entraîner un dysfonctionnement de certaines fonctions cellulaires et induire un biais dans notre modèle murin. Aucune forme familiale jusqu'à présent, ne combine plusieurs mutations des gènes impliqués dans la maladie. Un modèle simple transgénique pourrait être un moyen de vérifier si la présence de multiples mutations est un biais en soi.

Le modèle murin, qu'il soit simple, double, ou triple transgénique ne pourra jamais reproduire exactement la maladie humaine, d'où l'expression « Alzheimer like disease ». Certaines caractéristiques neuropathologiques telles que l'atrophie cérébrale ne sont pas observées dans les modèles, tandis que les pertes neuronales et la neurodégénérescence ne le sont que très rarement. Les plaques amyloïdes ont une progression topographique différente de la maladie humaine. Les dégénérescences neurofibrillaires, corrélées avec la progression des fonctions cognitives chez l'homme, ne sont pas présentes chez tous les modèles.

Cependant, ces modèles nous ont permis de réaliser de grandes avancées dans la compréhension de certains mécanismes impliqués dans la maladie. Il est néanmoins important de croiser les observations faites sur les modèles transgéniques et chez les patients afin de réduire les erreurs d'interprétation.

L'analyse comparative de l'expression des gènes des souris transgéniques et des souris WT a révélé la modulation de plusieurs gènes décrits chez les patients dans les formes familiales et sporadiques [Zhang *et al.* 2013] : TREM2, TYROBP, C1QB, IBA1, CXCL16,  $\beta$ 2M, TLR2, CCL3, CCL4... Cela nous a permis de valider notre modèle et notre analyse de transcriptome.

Les différents traitements réalisés dans cette étude montrent un effet sur les fonctions cognitives. Les tests utilisés pour évaluer les altérations cognitives peuvent donner des résultats différents en fonction des fonds génétiques. Des études ont montré que les souris C57BL/6J comparées aux autres fonds génétiques (129/S6 et DBA/2J), montrent une bonne performance dans tous les tests évalués par Holmes et ses collègues [Holmes *et al.* 2002]. Ce qui conforte les résultats obtenus dans notre modèle. Cependant il faut être conscient du fait que les troubles cognitifs chez les souris transgéniques sont différents de ceux observés chez les patients, et sont moins complexes et moins sévères. Chez les patients MA, la mémoire épisodique et spatio-temporelle sont atteintes en premier, les patients ont des difficultés à former de nouveaux souvenirs, et peuvent difficilement s'orienter dans le temps et dans l'espace. Leur capacité d'apprentissage est fortement réduite. Les autres types de mémoires sont également affectés (sémantique et la mémoire à long terme) à des stades plus avancées. D'autres fonctions cognitives telles que l'attention, les fonctions exécutives, visuo-spatiales sont altérées plus ou moins tardivement. De plus, d'autres perturbations liées à la démence telles que l'aphasie, l'agnosie, l'apraxie... peuvent être observées.

Plusieurs tests, plus ou moins sensibles, sont disponibles pour évaluer ces différentes fonctions chez l'homme. L'évaluation des troubles cognitives dans les modèles murins est principalement basée sur l'étude des fonctions d'apprentissage et de mémoire, atteintes en premier chez l'homme. Les résultats de ces tests de comportement nous donnent une indication, bien que partielle, de l'effet potentiel d'un traitement chez l'homme. Cependant, seul un essai clinique peut montrer le bénéfice réel du traitement.

Notre étude montre une modulation des cellules microgliales par les Tregs. Ces cellules, en plus de la clairance des plaques et des débris cellulaires, sont impliquées dans plusieurs autres fonctions telles que le maintien de l'architecture neuronale et la formation et la maturation des synapses [Paolicelli *et al.* 2011]. Les cellules microgliales en produisant du BDNF contribuent aux mécanismes de plasticité synaptique et donc d'apprentissage [Parkhurst *et al.* 2013]. Il est donc possible qu'au moins une partie de l'effet des Tregs, passe par la modulation de ces mécanismes et non de ceux impliqués dans la clairance des plaques. Cependant, on ne peut pas exclure le fait que certaines formes d'A $\beta$  ne soient pas affectées par les Tregs. Il est probable que notre technique d'ELISA et d'immunohistochimie ne soient pas assez sensibles pour détecter les formes d'oligomères d'A $\beta$ , plus toxiques.

Par ailleurs, la pathologie amyloïde n'est pas toujours corrélée avec le phénotype de maladie observé. Des études ont montré que les plaques séniles peuvent être présentes dans le

cerveau de certains sujets âgés sans qu'aucune altération des fonctions cognitives ne soit constatée. De même, certains sujets présentent des dégénérescences et des fonctions cognitives altérées caractéristiques de la MA en absence de dépôts amyloïdes dans le cerveau [Wirth *et al.* 2013]. Des observations similaires chez les modèles murins de la pathologie amyloïde ont également été rapportées [Duyckaerts *et al.* 2008].

La déplétion des Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) a été réalisée par administration d'un anticorps anti-CD25 (clone PC61). Nous avons observé une forte déplétion des Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> après l'injection de l'anticorps. Nous avons également noté qu'une partie de la population de CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> n'est pas affectée par la déplétion. Cette technique de déplétion est efficace, mais n'est pas spécifique. Les cellules T conventionnelles activées augmentent leur expression de CD25. Cependant, notre analyse ne montre aucun effet significatif du traitement sur cette population cellulaire.

L'utilisation du modèle Foxp3eGFP lucidTR, disponible au laboratoire permettrait d'éliminer de façon spécifique les Tregs, et de s'affranchir d'un possible effet sur les T conventionnels activés. Les souris Foxp3eGFP lucidTR expriment la protéine fluorescente GFP et le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) sous contrôle du promoteur du Foxp3. L'injection de la toxine diphtérique cible la DTR dans les Tregs de façon spécifique. De plus, l'expression de la GFP permettrait de suivre les cellules facilement *in vivo* [Suffner *et al.* 2010]. La génération de souris APPPS1/ Foxp3eGFP lucidTR permettrait également d'étudier l'effet de la déplétion spécifique des Tregs à différents stades de la maladie.

De nombreuses preuves de l'efficacité et de non toxicité de l'administration de faibles doses d'IL-2 ont déjà été apportées. Dans notre étude, le traitement chronique des souris avec une faible dose d'IL-2 (50000UI) ralentit l'apparition des troubles cognitifs. Nous avons montré qu'un tel traitement amplifie de façon spécifique les Tregs. Les cellules NK, les lymphocytes B, les macrophages et les DCs ne sont pas affectés. Il serait intéressant de déterminer les mécanismes par lesquels l'IL2 entraîne la prolifération de Tregs et le type de Tregs amplifié. Les tTregs provenant du thymus sont sensibles à l'IL2 et leur fréquence est potentiellement augmentée. L'IL2 peut également amplifier les populations d'iTregs (induits en périphérie) ou favoriser la génération d'iTregs à partir de T naïfs. De plus, d'autres études de caractérisation des mécanismes d'action des Tregs seraient nécessaires pour avoir une vision plus large de l'effet bénéfique des Tregs.

Il serait également important de valider ces résultats par d'autres techniques d'amplification de Tregs. Un transfert adoptif de Tregs issus de souris WT donneuses spécifiques de l'antigène ou non pourrait être réalisé, et les résultats seront comparés à ceux obtenus avec le traitement avec l'IL2 sur la progression de la maladie. Des Tregs générés *in vitro* (iTregs) en présence d'IL10, de TGF $\beta$  et d'IL2 peuvent également être transférés aux souris APPPS1 ou Wt.

L'effet bénéfique des Tregs sur la progression de la maladie passe par la modulation du recrutement des cellules microgliales autour des plaques amyloïdes. Ce terme de cellules microgliales dans cette étude regroupe toutes les cellules positivement marquées avec l'Iba1 et le CD68.

Des données précédentes de notre laboratoire ont montré une forte expression du CCL2 dans le tissu cérébral (données non publiées), suggérant un recrutement de cellules myéloïdes dans le SNC. Une fois dans le parenchyme cérébral, la distinction entre les macrophages et les cellules microgliales résidentes est difficile. L'une des perspectives de ce travail est d'identifier les cellules recrutées autour des plaques.

Bruce Lamb et son équipe, dans un article récent, suggèrent que les cellules TREM2<sup>+</sup> associées aux plaques sont des macrophages d'origine périphérique et ont une forte expression de CD11b, CD45 et F4/80. Les cellules microgliales quant à elles sont marquées avec du P2RY12 et sont localisées un peu partout dans le parenchyme [Jay *et al.* 2015]. Ces résultats sont intéressants étant donné que nos analyses de transcriptome ont montré une augmentation de l'expression de TREM2 dans les souris APPPS1.

Nous avons donc récemment entrepris d'autres expériences d'immunohistochimie, sur les mêmes échantillons que ceux utilisés dans notre étude afin d'identifier nos cellules sur la base de l'expression du TREM2. Les résultats préliminaires indiquent en effet la présence de cellules TREM2<sup>+</sup>, principalement autour des plaques. La distinction entre cellules microgliales et macrophages devrait être réalisée avec un co-marquage TREM2/ P2RY12.

Le P2RY12 serait un marqueur spécifique des cellules microgliales [Haynes *et al.* 2006; Butovsky *et al.* 2014b]. Ce récepteur purinergique joue un rôle important dans la fonction microgliale et n'est pas exprimé sur les macrophages ni sur les astrocytes. Il semblerait donc qu'il soit un bon marqueur de distinction des deux populations.

L'analyse de transcriptome réalisée dans cette étude avait pour but d'explorer d'un ensemble de mécanismes potentiellement modulés par les Tregs au cours de la maladie. Elle

nous a permis en effet de mettre le doigt sur certains gènes liés à la maladie et différentiellement modulés par le traitement avec l'anti-CD25. De façon intéressante, ces gènes sont impliqués dans diverses fonctions et voies de signalisation telles que les réponses inflammatoires, le développement et la fonction du système nerveux, le comportement, le développement et la fonctionnalité du système cardiovasculaire.

L'*ubiquitin-specific protease 18* (USP18) et le récepteur à l'interféron de type I,  $\alpha$  et  $\beta$  (IFNAR2) font partie des gènes impliqués dans les processus neuroinflammatoires modulés par la maladie et par les Tregs. L'expression de ces deux gènes augmente chez les souris APPPS1 sous l'effet de la déplétion.

USP18 est une enzyme spécifique de l'ubiquitination, jouant un rôle important dans les réponses immunitaires, notamment dans la modulation fonctionnelle des cellules microgliales. Cette protéine est exprimée dans les cellules microgliales et les cellules T (Th1, Th17, Th2 et Tregs), les Tregs exprimant 10 fois moins la protéine que les T effecteurs [Liu *et al.* 2013]. IFNAR2 médie la signalisation des interférons de types I par l'activation de certains facteurs de transcription dont Stat1 et Stat2 (*signal transducer and activator of transcription*). Les IFN  $\alpha$  et  $\beta$  sont impliqués dans les mécanismes de défense contre les agents viraux. Une expression constitutive à un certain niveau de ces IFN est importante pour le maintien, la maturation et la mobilisation du système immunitaire. Par conséquent, leur régulation est extrêmement cruciale dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Les IFN de type I ont également été associés à des altérations liées au vieillissement dont les troubles cognitifs et la neuroinflammation chronique [Baruch *et al.* 2014].

Les IFNAR sont exprimés sur plusieurs types cellulaires incluant les cellules T, les macrophages, les monocytes, les astrocytes et les cellules microgliales. Un rôle bénéfique des IFN de type I sur les cellules myéloïdes passant par une modulation de leur état d'activation a été décrit [Prinz *et al.* 2008]. Ce contrôle de l'état d'activation des cellules microgliales pourrait être médié, au moins en partie, par USP18. Une étude récente a montré que ce dernier est un régulateur négatif des cellules microgliales de la substance blanche. L'USP18 maintient dans un état « quiescent » les cellules microgliales, en se liant à IFNAR2 et en contrôlant ainsi la signalisation des IFN de type I. En son absence, la voie de signalisation est activée après la fixation de l'IFN sur son récepteur. S'ensuit alors, une activation prolongée de Stat1 et le déclenchement d'une cascade de signalisation aboutissant à l'activation des cellules microgliales [Goldmann *et al.* 2015].

Dans notre modèle murin, nous avons observé une augmentation d'USP18 et d'IFNAR2 en réponse à la déplétion des Tregs, basés sur les publications précédentes, ces résultats suggèrent une inhibition de l'activation microgliale en absence des Tregs à des stades précoces de la maladie.

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de marquage d'USP18 et de Stat1 sur des coupes cerveau de souris APPPS1 et WT traitées avec l'anti-CD25, l'IL2 ou PBS sont déjà prévues au laboratoire. L'USP18 étant décrite principalement dans les cellules microgliales de la substance blanche, une analyse comparative de l'expression des gènes dans différentes zones du cerveau serait très informative pour la suite de notre étude. Les cellules localisées autour des plaques pourraient également être analysées par des techniques de microdissection, afin de nous donner un aperçu plus précis des mécanismes d'activation et de recrutement des cellules myéloïdes au cours de la maladie.

L'effet des Tregs sur la progression de la MA n'est pas connu. Notre étude montre que les Tregs ralentissent la progression de la maladie. Nos données ne s'inscrivent pas dans le concept d'« autoimmunité » protectrice décrit par Michal Schwartz et Jonathan Kipnis.

Par ailleurs, une étude récente menée par l'équipe de Michal Schwartz rapporte un effet délétère des Tregs dans la maladie [Baruch *et al* 2015]. Les auteurs montrent que la déplétion des Tregs entraîne un recrutement massif de cellules myéloïdes et de cellules T dans le cerveau à travers les plexus choroïdes. Dans leur étude, cette infiltration de cellules périphériques est corrélée avec une augmentation de l'expression de Foxp3 et d'IL10 et une amélioration des fonctions cognitives. Inversement, l'amplification des réponses régulatrices diminue le recrutement des cellules au niveau des plexus choroïdes et aggrave les déficits cognitifs.

Il est important de souligner qu'il existe des différences majeures entre les deux études qui pourraient expliquer les résultats opposés obtenus de part et d'autre. Dans leur étude, les auteurs ont utilisé un modèle transgénique différent, le 5XFAD qui présente à la fois cinq mutations de la forme familiale de la maladie. Trois mutations de l'APP, suédoise K670N/M671L, Floride I716V et Londres V717I, et deux mutations de la PS1, M146L et L286V. Ce modèle présente des plaques amyloïdes à partir de l'âge de 2 mois et des troubles cognitifs dès l'âge de 5 mois. Ces mutations ont été introduites dans des souris de fond génétique hybride C57/BL6-SJL.

Leur protocole de modulation des Tregs et d'analyse est également très différent de celui mis en place dans notre étude. Leurs expériences de déplétion ou d'activation des Tregs ont lieu très tardivement par rapport aux nôtres, 5, 6 ou 7 mois, au moment où les dépôts amyloïdes et les déficits cognitifs sont déjà présents. De plus, l'effet de la déplétion est analysé seulement 3 à 4 semaines après les dernières injections de DT, donc à court terme. Alors que dans notre étude, l'analyse de l'impact de la déplétion des Tregs est réalisée deux mois après la dernière injection d'anti-CD25 (PC61).

Malgré leur conclusion sur l'effet délétère des Tregs sur la progression de la maladie, un de leurs résultats fondamentaux montre une infiltration de cellules périphériques corrélée avec une augmentation de l'expression de Foxp3 et d'IL10 et une amélioration des fonctions cognitives. Cela suggère une mise en place d'une réponse régulatrice et rejoint notre résultats montrant un effet bénéfique des Tregs dans la progression de la MA.

Nous avons montré un effet neuroprotecteur des cellules T régulatrices dans la physiopathologie de la MA en modulant, la fonctionnalité des cellules microgliales à des stades précoces de la maladie, passant probablement par la modulation de la voie des IFN de type I. Cette étude met en avant le potentiel thérapeutique des approches basées sur la modulation des réponses Tregs au cours de la maladie. Cet effet bénéfique pourrait être atteint par une administration de faibles doses d'IL-2, dont l'efficacité a déjà été montrée dans d'autres contextes pathologiques. Cependant, une caractérisation et la compréhension des mécanismes sous-jacents seront nécessaires afin de générer une stratégie thérapeutique sûre pour une utilisation chez l'homme.

# ANNEXES

**I. ANNEXE1: Article 2 Vaccine-induced A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease**

Vaccine-induced A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells do not  
trigger autoimmune neuroinflammation in a murine  
model of Alzheimer's disease

Martine Bruley Rosset, Gabrielle Lui, **CIRA DANSOKHO**, Thomas Chaigneau, Guillaume Dorothee.

May 2015, *Journal of Neuroinflammation*.

RESEARCH

Open Access

# Vaccine-induced A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease

Martine Bruley Rosset<sup>1,2\*</sup>, Gabrielle Lui<sup>1,2</sup>, Cira Dansokho<sup>1,2</sup>, Thomas Chaigneau<sup>1,2</sup> and Guillaume Dorothée<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Active immunization against A $\beta$  was reported to have a therapeutic effect in murine models of Alzheimer's disease. Clinical A $\beta$  vaccination trial AN1792 was interrupted due to the development in 6 % of the patients of meningoencephalitis likely involving pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells. However, the potential implication of auto-aggressive anti-A $\beta$  CD8<sup>+</sup> T cells has been poorly investigated.

**Methods:** Potential MHC-I-restricted A $\beta$ -derived epitopes were first analyzed for their capacity to recruit functional CD8<sup>+</sup> T cell responses in mouse models. Their impact on migration of CD8<sup>+</sup> T cells into the brain parenchyma and potential induction of meningoencephalitis and/or neuronal damage was investigated upon vaccination in the APPPS1 mouse model of AD.

**Results:** We identified one nonamer peptide, A $\beta$ 33-41, which was naturally processed and presented in association with H-2-D<sup>b</sup> molecule on neurons and CD11b<sup>+</sup> microglia. Upon optimization of anchor residues for enhanced binding to H-2-D<sup>b</sup>, immunization with the modified A $\beta$ 33-41NP peptide elicited A $\beta$ -specific IFN $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells, which are cytotoxic towards A $\beta$ -expressing targets. Whereas T cell infiltration in the brain of APPPS1 mice is dominated by CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells and increases with disease evolution between 4 and 7 months of age, a predominance of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> over CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells was observed in 6- to 7-month-old APPPS1 but not in WT animals, only after vaccination with A $\beta$ 33-41NP. The number of CD11b<sup>+</sup> mononuclear phagocytes, which significantly increases with age in the brain of APPPS1 mice, was reduced following immunization with A $\beta$ 33-41NP. Despite peripheral activation of A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic effectors and enhanced infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells in the brain of A $\beta$ 33-41NP-immunized APPPS1 mice, no clinical signs of severe autoimmune neuroinflammation were observed.

**Conclusions:** Altogether, these results suggest that A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells are not major contributors to meningoencephalitis in response to A $\beta$  vaccination.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Vaccination, A $\beta$  peptide, CD8<sup>+</sup> T cells, Encephalitis

## Background

Alzheimer's disease (AD) is a severe neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of memory and cognitive functions. Accumulation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ), both as soluble oligomers and in the form of amyloid plaques, plays a key role in initiating the pathogenic

cascade in AD. Induction of specific adaptive immune responses following vaccination against A $\beta$ 1-42 was reported to be of benefit in animal models of AD [1–3]. Antibodies to A $\beta$ 1-42 were proved efficient in clearing amyloid plaques and in attenuating pathology in mouse models of the disease [4, 5]. In line with these encouraging results, clinical vaccination trial (AN1792) was initiated and, although modest beneficial effects were observed in a cohort of A $\beta$ 1-42-immunized AD patients, 6 % of them developed meningoencephalitis [6]. Postmortem neuropathological examination carried out in few A $\beta$ -vaccinated patients who developed such severe side effects revealed

\*Correspondence: martine.rosset@inserm.fr; guillaume.dorothee@inserm.fr  
<sup>1</sup>INSERM, UMR\_S 938, CdR Saint-Antoine, Laboratory Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases, Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France  
<sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 938, CdR Saint-Antoine, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

the presence of CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T cells, together with extensive macrophage infiltration and a reduction in amyloid burden [7, 8]. Second-generation immunotherapy trials that rely exclusively on A $\beta$ -specific antibodies were then initiated, based either on the intravenous infusion of humanized anti-A $\beta$  monoclonal antibodies (mAbs) or vaccination strategies using the N-terminal portion of A $\beta$  to elicit antibodies without inducing A $\beta$ -specific T cell responses. Among these strategies, trials with bapineuzumab [9, 10] and solanezumab [11] were the most advanced, but results of phase 3 studies released in summer 2012 indicated that both antibodies were inefficient at improving cognitive performance in AD patients. Failure of these trials underlined the need for readdressing the therapeutic capability of antibodies alone, and the role of T cells in the therapeutic effect and/or meningoencephalitis observed in initial immunization studies based on vaccination with full-length A $\beta$ .

Increased T cell reactivity to A $\beta$  has been observed in the blood of elderly subjects and patients with AD, and various A $\beta$ -derived HLA class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cell epitopes have been described [12]. Different HLA-DR alleles were shown to impact A $\beta$  immunogenicity in humans and were associated with A $\beta$ -specific T cell responses to distinct T cell epitopes within residues 15–42 of A $\beta$  [13]. A $\beta$ -derived epitopes eliciting CD4<sup>+</sup> T cell responses have also been identified in different mouse haplotypes and HLA class II transgenic mice [14–17]. Immunization of F1 SJLxB6 amyloid precursor protein (APP) transgenic (APP-Tg) AD mice with dominant T cell epitope A $\beta$ 10-24 stimulated peripheral CD4<sup>+</sup> T cell responses but did not result in T cell infiltration nor the occurrence of meningoencephalitis. However, enhanced expression of IFN $\gamma$  in the brain of APP-Tg mice promotes T cell infiltration targeted primarily to the sites of A $\beta$  deposition and was associated with both clearance of A $\beta$  and transient encephalitis upon immunization with A $\beta$ 10-24, in the absence of antibodies to A $\beta$  [18]. Altogether, these reports suggest that the magnitude of A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses critically depends on the nature of A $\beta$ -derived T cell epitopes, which significantly vary with MHC genotype. Thus, inappropriate boosting of endogenous naturally occurring A $\beta$ -specific CD4<sup>+</sup> T cell responses, e.g. through vaccination in the presence of a Th1 adjuvant, may likely be involved in the development of meningoencephalitis in selected AN1792 patients displaying given MHC haplotypes.

Besides CD4<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$ , vaccination with full-length A $\beta$ 1-42 may also activate A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells. The characterization of such potentially autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells has received little attention, presumably because of their expected implication in the direct killing of CNS cells and thus reduced therapeutic interest [19]. It was previously reported that vaccination of BALB/c mice

with A $\beta$ -encoding DNA elicited IFN $\gamma$  secretion by splenocytes upon in vitro stimulation with A $\beta$ 12-28 but not A $\beta$ 10-20, suggesting that a dominant immunogenic epitope lies within amino acids 21 through 28. Reduction of IFN $\gamma$  secretion upon depletion of CD8<sup>+</sup> T cells identified the phenotype of these effectors [15]. Nevertheless, the potential impact of such MHC-I-restricted A $\beta$ -specific T cell responses on disease evolution and the development of meningoencephalitis upon immunization remains unknown.

In order to evaluate the role of A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells in a mouse model of AD, we aimed at identifying MH class I-restricted A $\beta$ -derived epitopes able to recruit functional CD8<sup>+</sup> T cell responses in C57BL/6 mice. Vaccination with such epitopes in the absence of concomitant A $\beta$ -specific humoral nor CD4<sup>+</sup> T cell responses was used to analyze the migration of CD8<sup>+</sup> T cells into the brain parenchyma of APPPS1 mice, and their potential role in the induction of meningoencephalitis and/or neuronal damage. We identified one H-2-D<sup>b</sup>-restricted naturally processed peptide, A $\beta$ 33-41, which elicits A $\beta$ -specific IFN $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells displaying in vitro cytotoxic activity towards A $\beta$ -expressing targets. A $\beta$ 33-41 was naturally processed and presented by CD11b<sup>+</sup> microglia in the brain of APPPS1 but not WT mice. Despite peripheral activation of functional A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> effectors and enhanced CD8<sup>+</sup> T cell infiltration into the brain parenchyma of APPPS1 mice immunized with anchor-optimized A $\beta$ 33-41NP, no clinical signs of autoimmune neuroinflammation were observed.

## Methods

### Mice and ethics statement

C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup> haplotype) were purchased from Elevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). HLA-A02.01/HLA-DR1-transgenic, H-2<sup>b</sup> class I/II-knockout mice [20, 21] on the C57BL/6 background were kindly provided by Pr François Lemonnier (Paris, France) and were bred in our animal facility. APPPS1 double transgenic mice (Thy1-APP<sup>KM670/671NL</sup>; Thy1-PS1<sup>L166P</sup>) which overexpress mutated human APP and presenilin 1 genes on the C57BL/6 background were kindly provided by Pr. Mathias Jucker (Tübingen, Germany) [22]. Animals were bred and maintained under strictly monitored specific and opportunistic pathogen-free conditions. All experimental protocols were conducted in accordance with good practices on the care and use of laboratory animals, as defined by the relevant national and/or local animal welfare bodies. Animal studies were approved by the ethics committee of the Alfort School of Veterinary Medicine.

### Plasmids and peptides

A pcDNA3.1 vector encoding the human APP sequence was used for DNA vaccination as already described [23].

Empty pcDNA3.1 plasmid was used as control. Nona-mer peptide sequence bearing H-2-D<sup>b</sup>-binding motifs were selected by applying the epitope prediction algorithm BIMAS ([www.bimas.cit.nih.gov/](http://www.bimas.cit.nih.gov/)) to human APP amino acid sequence. Amino acids were substituted at anchor positions for H-2-D<sup>b</sup> binding (positions 1, 2, 3, 5, and 9) [24] by amino acids from a high binding affinity peptide from the influenza nucleoprotein (NP366). Modified peptides were mentioned as NP peptides. Native and modified peptides (purity >90 %) were purchased from GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Human A $\beta$ 1-42 peptide was dissolved at 40 mg/ml in DMSO and stored at -20 °C. Panel of A $\beta$ -derived 9-mer peptides overlapping by three amino acids were dissolved at 3 mM in DMSO, before final dilution in RPMI medium for in vitro T cell stimulation.

#### Immunization protocols

For DNA vaccination, mice received two or three intramuscular injections of 100  $\mu$ g of APP-pcDNA at weekly interval [24]. These mice were sensitized 5 days before with 50  $\mu$ g cardiotoxin. For A $\beta$  peptide immunization, 6- to 8-week-old mice were immunized by footpad injections with 100  $\mu$ g of A $\beta$ 1-42 emulsified in an equal volume of CFA. In some experiments, mice were boosted with 60  $\mu$ g of A $\beta$ 1-42 emulsified in an equal volume of IFA. When indicated, mice were injected sc at the base of the tail with 100  $\mu$ g of peptide, 50  $\mu$ M of oligo-CpG (N<sup>o</sup>3678), and 100  $\mu$ g of the I-A<sup>b</sup>-binding hepatitis B virus (HBV) core peptide emulsified in an equal volume of IFA.

**Measurement of relative affinity of peptides for H-2-D<sup>b</sup>**  
RMAS lymphoma cells are deficient for TAP molecules in charge of endogenous peptide transport and thus express empty and unstable MHC class I molecules. To

evaluate the capacity of peptides to bind and stabilize H-2-D<sup>b</sup> molecules, RMAS cells were incubated for 4 h at 27 °C with various concentrations of peptides. Cells were then washed and cultured for an additional 4-h period at 37 °C in complete culture medium without peptides. For staining,  $2 \times 10^5$  peptide-loaded RMAS cells were incubated for 20 min at 4 °C with biotin-conjugated H-2-D<sup>b</sup>-specific mAb (clone 28-14-8, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), followed by phycoerythrin-conjugated streptavidin. Samples were analyzed with a FACSCalibur (BD) flow cytometer, and data were processed using the FlowJo software (Tree star, San Carlos, CA, USA). Cell-surface fluorescence was expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

#### Anti-A $\beta$ antibodies measurement by ELISA

To measure serum anti-A $\beta$  antibody titers in immunized mice, flat-bottom Nunc MaxiSorp ELISA plates were

coated overnight at 4 °C with A $\beta$ 1-42 peptide (1  $\mu$ g/ml in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3). Plates were then washed twice with PBS-T and blocked with PBS-1 % BSA for 2 h at room temperature (RT). After two washes, plates were incubated for 2 h at RT with serum samples at various dilutions in blocking buffer. The A $\beta$ 1-17-specific mAb 6E10 (0.01 and 1  $\mu$ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was used as a positive internal reference sample. Plates were washed and incubated 90 min at RT with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (Amersham, Little Chalfont, UK) and then revealed with O-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate (Sigma-Aldrich). Results were expressed as relative OD = Experimental OD/Reference OD for 6E10 mAb in the same plate.

#### FACS analysis

Single-cell suspensions were prepared from the spleens and incubated for 15 min with anti-Fc receptor blocking Ab (2.4G2, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) to avoid non-specific staining. FITC-conjugated anti-CD4 (L3T4), APC-conjugated anti-CD8 (clone 53-6-7), and PE-conjugated anti-CD19 (clone 1D3) mAbs (all from BD Biosciences) were used for cell-surface staining. Stained cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer, and data were processed using FlowJo.

#### Isolation of adult microglial cells

Brains were dissected, finely minced, and incubated in 5 ml PBS-1X 0.5 % BSA with 0.2 mg/ml Collagenase IV (Roche, France) and 0.5 mg/ml DNase I (Sigma) for 35 min at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After incubation, EDTA (10 mM) was added to the suspension and tissue was mechanically disrupted gently and cell suspensions were passed through a 70- $\mu$ m cell strainer. Cells were then washed with PBS-1X 0.5 % BSA, resuspended in 4 ml of 30 % percoll solution and transferred into a 15-ml tube. Four ml of 37 % percoll was then added below the cell suspension, followed by 4 ml of 70 % percoll under the previous 37 % layer. Cells were then centrifuged at RT for 40 min at 800 g, supernatant containing the myelin was removed, and interphase layer of mononuclear cells was harvested. Cells were washed with PBS-1X 0.5 % BSA, and microglial cells were further purified using anti-CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotec, Paris, France), according to manufacturer's instructions. Purity of isolated CD11b<sup>+</sup> cells was >90 %, as verified by flow cytometry.

#### ELISPOT assay

Nitrocellulose-based 96-well plates (Millipore, Billerica, MA, USA) were coated with anti-mouse IFN- $\gamma$  capture mAb (1  $\mu$ g/ml; clone R4-6A2, BD Biosciences) and saturated with complete culture medium. Responder splenocytes from individual mice were seeded at  $10^6$  or  $5 \times 10^5$

cells/wells and cultured with medium alone or containing 10 µg/ml of peptide. In some experiments, splenocytes were stimulated with CD11b<sup>+</sup> microglia ( $3 \times 10^4$ /wells) isolated from the brain of WT or APPPS1 mice, or with mitomycin-treated 1C11 cells ( $2 \times 10^4$ /wells), a neuronal cell line expressing both APP and H-2<sup>b</sup> MHC-I but not MHC-II molecules [25, 26]. Plates were incubated at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> for 18 h, washed, and incubated with biotinylated anti-mouse IFN $\gamma$  detection mAb (0.5 µ/ml; clone XMG1.2, BD Biosciences). Alkaline phosphatase conjugated to streptavidin (Roche, France) (1/500 dilution, 100 µL/well) was then added. IFN $\gamma$ -secreting cells were visualized using TNB/BCIP substrate (Promega, Charbonnières, France), and spots were counted using an automatic ELISPOT plate reader. Samples were assayed in triplicate, and the frequency of peptide-specific T cells was calculated after subtracting the mean number of spots obtained in the absence of peptide or cells.

#### **In vitro <sup>51</sup>Cr release cytotoxicity assay**

Spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml) from immunized mice were cultured at 37 °C with the matching NP peptide in complete medium for 5 days. RMAS or 1C11 target cells were labeled with <sup>51</sup>Cr for 1 h at 37 °C, followed by extensive washes.  $10^5$  <sup>51</sup>Cr-labeled RMAS cells/wells were then incubated with matching NP peptides (10 µg/ml) for 2 h in triplicate in 96-well round-bottom plates. Immune effectors were then added at various E:T ratios. Alternatively,  $2 \times 10^4$  <sup>51</sup>Cr-labeled 1C11 cells/wells were incubated with immune effectors at various E:T ratios. Culture supernatants were collected 4 h later, and <sup>51</sup>Cr release (cpm) was measured in a  $\gamma$  counter (LKB, Orsay, France). The percentage of cytotoxicity was calculated as follows:  $[1 - (\text{experimental release} - \text{minimum release} / \text{maximum release} - \text{minimum release})] \times 100$ , where minimum release was the amount of <sup>51</sup>Cr released by target cells without effectors, and maximum release was the total amount of <sup>51</sup>Cr obtained after lysis of  $10^5$  RMAS or  $2 \times 10^4$  1C11 cells.

#### **Monitoring the percentage of peptide specific CD8<sup>+</sup> T cells in immunized mice**

Blood was collected at different time points after vaccination, and RBC were lysed. The frequency of 23-31NP- and 33-41NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells was assessed by intracellular IFN $\gamma$  staining of CD8<sup>+</sup> cells after 4 h of incubation with either medium alone or with the native or NP peptides, in the presence of brefeldin A (Cytofix/Cytoperm Plus Golgi Plug Kit, BD Biosciences). The percentage of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells among CD8<sup>+</sup> lymphocytes was evaluated by FACS.

#### **Immunohistochemistry analyses**

Brains collected at different disease stages were frozen in OCT compound (VWR, Leuven, Belgium). The 5-µm cryosections were prepared using a Leica RM2145 microtome and labeled with rabbit anti-mouse CD3 mAb revealed with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (Life Technologies), in combination with rat anti-mouse CD8 mAb (Relia Tech Gmb, Braunschweig, Germany) revealed with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rat mAb. Mononuclear phagocytes were detected using a rat anti-mouse CD11b mAb (eBiosciences, Paris, France) revealed with Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat mAb. At least three nonadjacent sections from the midbrain area were analyzed, and Dapi-positive stained cells were counted. Numbers were normalized according to the tissue section surface area calculated by the ImageJ software, and three mice per treatment were examined. Amount of hA $\beta$  deposition was evaluated using mouse anti-human A $\beta$  mAb (BAM10, Sigma-Aldrich) revealed with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse mAb.

#### **Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out with Graphpad Prism software (San Diego, CA, USA), using the Mann-Whitney U test.

#### **Results**

##### **Humanized HLA-A2.1/HLA-DR1 mice do not constitute an appropriate model for assessing A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell responses**

Since T cell reactivity is strongly modulated by MHC genotype, we first examined whether A $\beta$ 1-42 comprises epitopes able to bind human MHC-I molecules. In silico analysis of binding affinities for a large number of MHC class I alleles (29 HLA-A or -B) of A $\beta$ 1-42-derived candidate nonamer peptides was carried out using BioInformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) predictive algorithm. Whereas a large proportion of alleles did not bind any A $\beta$ -derived nonamer, about 30 % of tested alleles bound potential A $\beta$ -derived epitopes with an affinity ranging from high to moderate (Table 1). Among these, HLA-A2.01 was found to potentially bind A $\beta$ 16-24 (BIMAS score: 453) and A $\beta$ 33-41 (BIMAS score: 15). These data indicate that A $\beta$  can potentially promote the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses in selected MHC haplotypes. To assess this hypothesis, HLA-A2.1/HLA-DR1/H-2<sup>b</sup><sup>-/-</sup> double Tg mice on the C57BL/6 background (19–20) were immunized with A $\beta$ /CpG/IFA. Analysis of splenocytes 14 days later showed that only CD4<sup>+</sup> T cells that secrete IFN $\gamma$  responded to A $\beta$ 1-42 immunization and recognized an immunodominant epitope located between amino acids 1–18 (Fig. 1a). Of note, A $\beta$ 28-42 15-mer candidate peptide could not

**Table 1** Epitope prediction by BIMAS algorithm: estimated binding affinities of A $\beta$ -derived nonamers to various HLA molecules

HLA molecule	Start AA position	Nonamer peptide	BIMAS score <sup>a</sup>
A1	20	VFFAEDVGS	18
A02.01	16	KLVFFAEDV	453
	33	GLMVGGVVI	15
A02.05	31	IIGLMVGGV	6
A24	9	GVEVHHQKL	396
A3	16	KLVFFAEDV	2
A11.01	-	-	-
A31.01	-	-	-
A33.02	7	DSGYEVHHQ	1.5
A68.01	24	VGSNKGAI	24
B14	4	FRHDSGYEV	4
B27.02	4	FRHDSGYEV	20
	2	AEFRHDSGY	15
B27.05	4	FRHDSGYEV	600
	2	AEFRHDSGY	75
	15	QKLVFFAED	27
	8	SGYEVHHQK	25
B28.01	-	-	-
B35.01	26	SNKGAIIGL	3
B37.01	-	-	-
B38.01	12	VHHQKLVFF	30
B39.01	-	-	-
B39.02	27	NKGAIIGLM	12
B40	2	AEFRHDSGY	32
	10	YEVHHQKLV	16
B44.03	2	AEFRHDSGY	240
B51.01	24	VGSNKGAI	104
	32	IIGLMVGGVV	57
	28	KGAIIGLMV	24
B51.02	33	GLMVGGVVI	132
	24	VGSNKGAI	88
	28	KGAIIGLMV	28
B51.03	32	IIGLMVGGVV	52
	24	VGSNKGAI	48
	28	KGAIIGLMV	40
B52.01	32	IIGLMVGGVV	300
	24	VGSNKGAI	75
	28	KGAIIGLMV	36
B62	32	IIGLMVGGVV	5
B7	26	SNKGAIIGL	4
B8	26	SNKGAIIGL	4

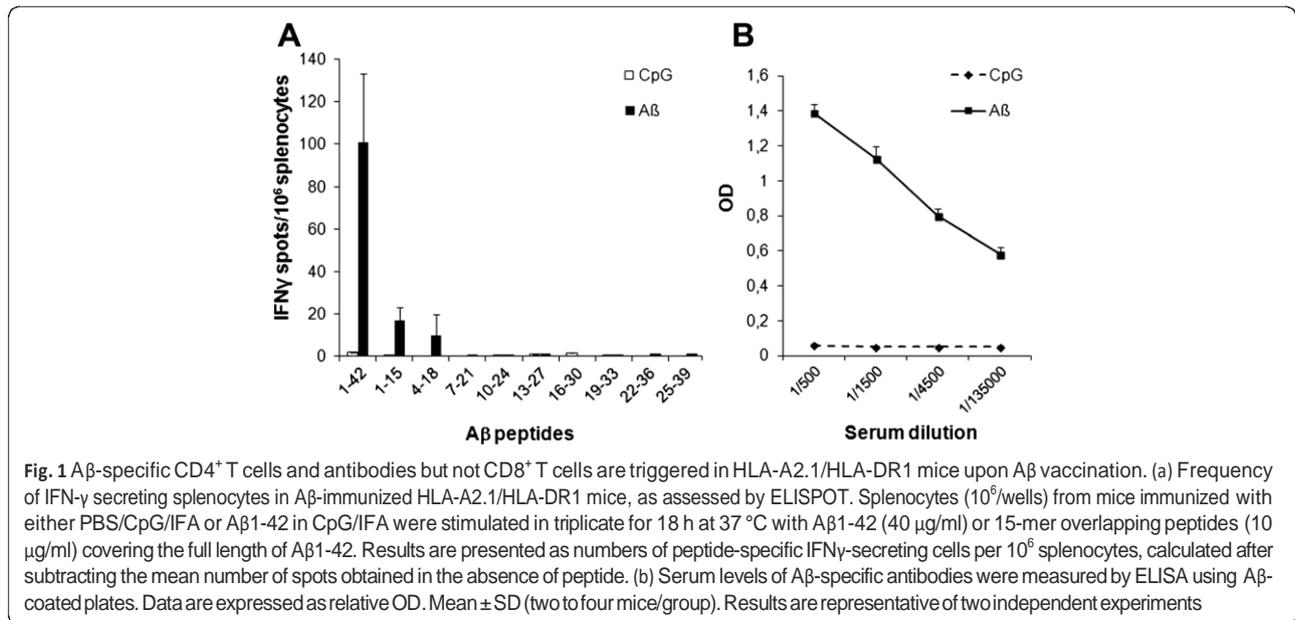
<sup>a</sup>Estimated half time of dissociation of corresponding MHC/peptide complexes, using BIMAS algorithm. Values above significant affinity threshold are depicted in italic

be productively synthesized, likely due to its very high hydrophobicity and poor solubility. Although we cannot rule out that such peptide may include a potential MHC-II-restricted epitope, its biochemical features make unlikely the efficient MHC binding and presentation of A $\beta$ 28-42. Moreover, A $\beta$ -specific antibodies were detected by ELISA in the serum of immunized mice (Fig. 1b). However, this immunization procedure did not trigger any CD8<sup>+</sup> T cells able to recognize dendritic cells loaded with either A $\beta$  or overlapping nonamer peptides covering the entire A $\beta$  sequence (data not shown).

The two HLA-A2.01-restricted A $\beta$ -derived epitopes, A $\beta$ 16-24 and A $\beta$ 33-41, were then mixed with a 14-mer human CD4<sup>+</sup> helper epitope (Padre) in CpG/IFA and used for sc immunization in HLA-A2.1/HLA-DR1 mice. Padre (pan-DR epitope) was used in all experiments using HLA-DR transgenic mice, based on its very high MHC-II binding and helper activity [27]. The number of IFN $\gamma$ -secreting splenocytes was high in response to the A $\beta$ -unrelated CD4<sup>+</sup> helper epitope but weak or null in response to the corresponding A $\beta$ -derived nonamer CD8<sup>+</sup> peptides (Fig. 2a). Phenotypic analysis revealed that the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was twice lower in the spleen of untreated HLA-A2.1/HLA-DR1 mice (7.8 and 4.9 %, respectively) than in regular C57BL/6 mice (16.4 and 10.4 %, respectively;  $p = 0.0003$ ) (Fig. 2b). Such altered basal numbers of CD8<sup>+</sup> T cells may contribute to the weak functional CD8<sup>+</sup> T cell responses to A $\beta$  vaccination in this mouse model. Altogether, these data suggest that A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell responses cannot be efficiently triggered in humanized HLA-A2.1/HLA-DR1/H-2<sup>b-/-</sup> mice.

#### A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells can be triggered in C57BL/6 mice by anchor-modified peptides

In order to appropriately address the impact of A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell responses in vivo, we aimed at identifying A $\beta$ -derived epitopes able to trigger specific CD8<sup>+</sup> T cells in regular C57BL/6 mice (H-2<sup>b</sup>). Mice were immunized with A $\beta$ /CpG/IFA, and splenocytes were analyzed 14 days later for the presence of A $\beta$ -specific T cells. Although splenocytes secreted IFN $\gamma$  in response to full-length A $\beta$ 1-42, none of the 12 overlapping A $\beta$ -derived nonamer peptides reactivated effector cells (Fig. 3a). Antibodies specific for A $\beta$ 1-42 were detected in the serum of immunized mice (Fig. 3b) and were predominantly of IgG1 and IgG2b isotypes, suggesting the development of a Th2 type immune response (Fig. 3c). Of note, attempts to generate A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell responses using APP-encoding DNA also failed (data not shown). These results suggest that vaccination with full-length A $\beta$  can efficiently elicit CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cell responses in the H-2<sup>b</sup> mouse haplotype, suggesting the poor immunogenicity of



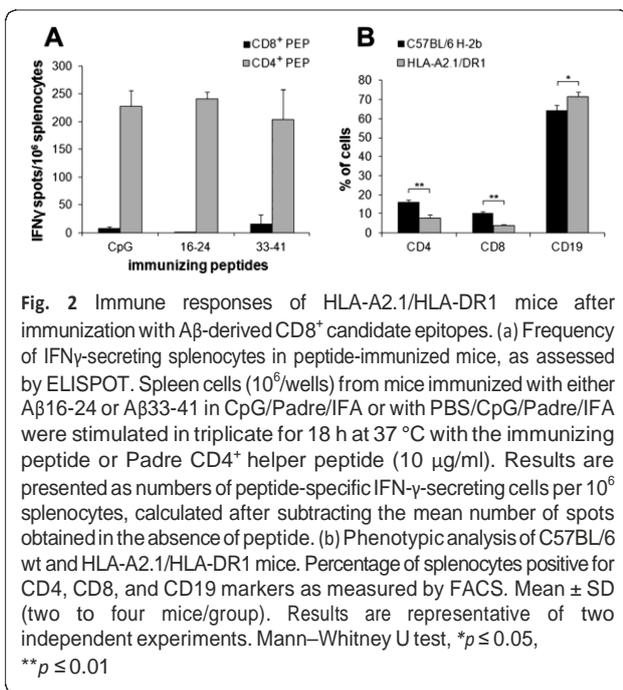
endogenously processed A $\beta$ -derived nonamer peptides in this MHC context.

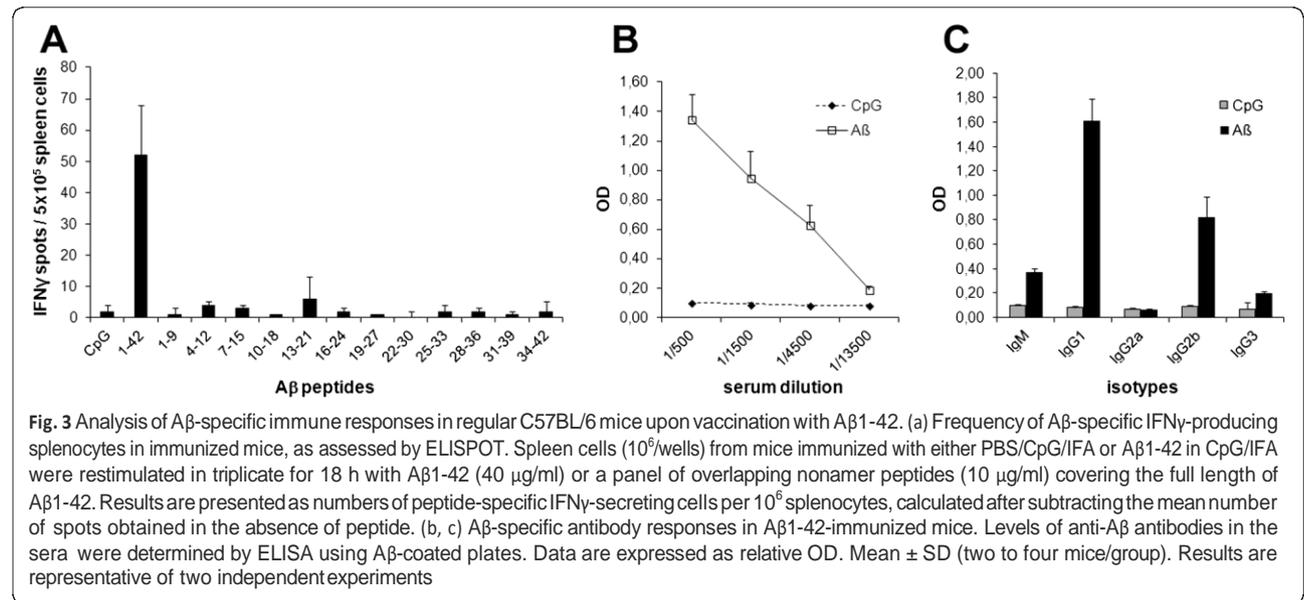
BIMAS predictive algorithm was used to identify A $\beta$ -derived nonamer peptides bearing MHC-I-binding motifs in H-2<sup>b</sup> haplotype. Two peptides were found to bind H-2-D<sup>b</sup> molecules with moderate (A $\beta$ 23-31, score 45) and low (A $\beta$ 33-41, score 4) theoretical affinities (Table 2), and none were found to bind H-2-K<sup>b</sup> molecules.

The candidate peptides were synthesized, and their actual affinity was determined by measuring their capacity

to bind and stabilize H-2-D<sup>b</sup> molecules on the cell surface of RMA5 cells. Incubation with various peptide concentrations weakly stabilized MHC class I expression as compared to incubation with a reference peptide of high affinity (Influenza virus nucleoprotein, NP366, score 286) (Fig. 4a). To increase binding affinities of A $\beta$ 23-31 and A $\beta$ 33-41, amino acids at H-2-D<sup>b</sup> anchor positions (P1, P2, P3, P5, and P9) were substituted by those of the high-affinity peptide NP366 (Table 2; NP peptides). These modifications highly increased the theoretical affinities of the two peptides (A $\beta$ 23-31NP, score 286; A $\beta$ 33-41NP, score 343) for H-2-D<sup>b</sup> molecules and lead to MHC class I stabilization on RMA5 cells to a similar level than with NP366 reference peptide (Fig. 4a).

C57BL/6 mice were immunized with native or NP-modified epitopes mixed with a 14-mer CD4<sup>+</sup> helper peptide (I-A<sup>b</sup>-restricted murine epitope, HBV core) in CpG/IFA. The frequency of CD8<sup>+</sup> T cells specific for the native or NP peptides was first evaluated in the blood by intracellular IFN $\gamma$  staining assay. In vitro restimulation for 4 h with native peptides did not result in enhanced percentages of peripheral CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells in any groups of treated mice (Fig. 4b). In contrast, upon in vitro restimulation with the immunizing NP peptide, mice immunized with 33-41NP displayed significantly higher percentages of CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells than mice receiving CpG alone (1.78 $\pm$ 0.19 versus 0.57 $\pm$ 0.11, respectively,  $p = 0.01$ ). Of note, no IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells were observed in CD8<sup>-</sup> lymphocytes, confirming that 33-41NP selectively triggers CD8<sup>+</sup> and not CD4<sup>+</sup> T cell responses (data not shown). Frequency of CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells was not consistently enhanced in the blood of 23-31NP-immunized mice, although two mice out of five had a detectable IFN $\gamma$





response (Fig. 4b). The magnitude and specificity of vaccine-induced immune responses was also measured by ELISPOT assay 14 days post immunization. Results indicated that splenocytes from 33-41NP-immunized mice but not splenocytes from mice immunized with the 33-41 native peptide significantly ( $p < 0.01$ ) secreted IFN $\gamma$  in response to the NP-modified but not to the native peptide. Notably, 33-41NP-specific splenocytes also did not respond to the NP366 peptide, confirming that they were specific for TCR-exposed residues from A $\beta$ 33-41 (Fig. 4c). In contrast, the number of IFN $\gamma$ -secreting splenocytes was not significantly enhanced in mice immunized with either A $\beta$ 23-31 or A $\beta$ 23-31NP (Fig. 4c). IFN $\gamma$ -producing cells were also detected in splenocytes from 33-41NP-immunized mice upon restimulation with 1C11 neuronal cells, which express both APP and H-2<sup>b</sup> MHC-I but not MHC-II molecules (Fig. 4c). Similar results were obtained with 1C11 cells when using CD8<sup>+</sup> T cells purified from 33-41NP-immunized splenocytes (data not shown). Importantly, splenocytes from 33-41NP-

immunized mice significantly ( $p < 0.01$ ) secreted IFN $\gamma$  in response to brain-derived CD11b<sup>+</sup> microglial cells isolated from APPPS1 mice but not from WT animals (Fig. 4d). Altogether, these results indicate that A $\beta$ 33-41 epitope can be naturally processed and presented in both microglia and neuronal cells, and that 33-41NP peptide efficiently stimulates an A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in C57BL/6 mice.

We next analyzed the cytolytic activity of splenocytes from NP-peptide-immunized mice. After a 5-day *in vitro* restimulation in the presence of 23-31NP or 33-41NP, cytotoxic activity towards <sup>51</sup>Cr-labeled peptide-loaded RMAS cells or 1C11 neuronal cells was evaluated. Immune effectors specific for 23-31NP or 33-41NP were able to lyse RMAS targets loaded with the matching NP peptides (50.7 and 65.9 % lysis, respectively; E:T ratio 1:50) (Fig. 5a). However, only splenocytes from 33-41NP-immunized mice moderately lysed (23.3 %) 1C11 cells (Fig. 5b). Thus, we identified one epitope, A $\beta$ 33-41, which is restricted to H-2-D<sup>b</sup> MHC class I molecule and is naturally processed in both microglia and neuronal cells. When anchor optimized, modified A $\beta$ 33-41 peptide can elicit anti-A $\beta$  CD8<sup>+</sup> T cell responses that display cytotoxic activity towards A $\beta$ -expressing neuronal target cells.

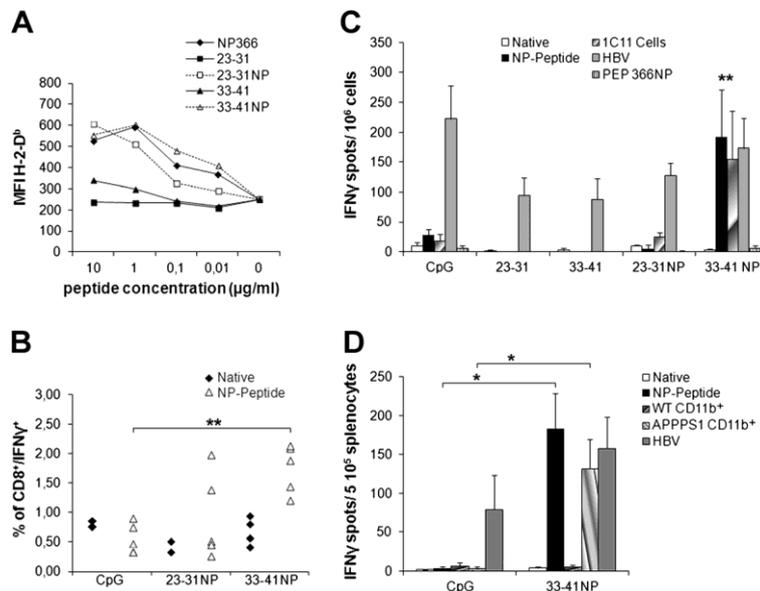
#### A $\beta$ 33-41NP activates specific CD8<sup>+</sup> T cells in APPPS1 mouse model of AD

The H-2-D<sup>b</sup>-restricted A $\beta$ -derived epitopes we identified were used to elicit A $\beta$ -specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell responses in the C57BL/6-based APPPS1 mouse model of AD [22]. APPPS1 mice and WT littermates were immunized between the age of 4 to 7 months with 23-31NP or 33-41NP mixed with CD4<sup>+</sup> helper peptide (HBV core) in CpG/IFA. The frequency of peptide-specific

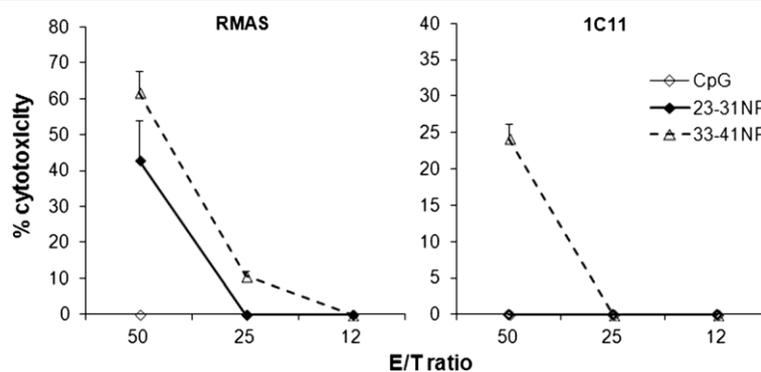
**Table 2** Sequence and binding affinity of A $\beta$ -derived H-2-D<sup>b</sup>-restricted candidate epitopes

Peptides	Amino acid sequences	BIMAS score <sup>a</sup>
A $\beta$ 23-31	D V G S N K G A I	45
23-31NP	A S N S N K G A M	286
A $\beta$ 33-41	G L M V G G V V I	4
33-41NP	A S N V N G V V M	343
NP366	A S N E N M D A M	286

Amino acid sequence of nonamer peptides derived from A $\beta$  using the BIMAS prediction algorithm. A $\beta$  peptides were modified (NP peptides) by replacing amino acids at the H-2-D<sup>b</sup> anchor sites (depicted in italic) by amino acids from a high-binding affinity peptide (influenza virus nucleoprotein NP366)  
<sup>a</sup>Estimated half time of dissociation of H-2-D<sup>b</sup>/peptide complexes, using BIMAS algorithm



**Fig. 4** Binding affinities and immunogenicity of Aβ-derived CD8<sup>+</sup> candidate epitopes. (a) RMA5 cells were incubated with indicated concentrations of native or NP-modified peptides, and cell surface stabilization of H-2-D<sup>b</sup> was evaluated by FACS. Data are presented as mean fluorescence intensity (MFI) of H-2-D<sup>b</sup> staining. NP366 served as a high-affinity reference peptide. (b) Frequency of IFN $\gamma$ -producing specific CD8<sup>+</sup> T cells in the blood of immunized mice. C57BL/6 mice were vaccinated with NP-modified peptides in CpG/HSV/IFA or with PBS/CpG/HSV/IFA, and animals were bled 14 days later. Percentage of peptide-specific T cells among CD8<sup>+</sup> cells in the blood was determined by intracellular IFN $\gamma$  staining after *in vitro* restimulation. (c, d) Frequency of Aβ-specific IFN $\gamma$ -producing splenocytes in immunized mice, as assessed by ELISPOT. (C) C57BL/6 mice were immunized with PBS/CpG/HSV/IFA or the indicated peptides in CpG/HSV/IFA, and 14 days later, spleen cells (10<sup>6</sup>/wells) were restimulated for 18 h with either the matching native or NP peptide, the HSV-derived helper peptide, or NP366 (10 μg/ml). For immunization with PBS/CpG/HSV/IFA, splenocytes were restimulated with each of the native or NP peptides and data were expressed as mean of the two values. Splenocytes were also stimulated with mitomycin-treated 1C11 cells (2 × 10<sup>4</sup>/wells), a neuronal cell line expressing both APP and H-2<sup>b</sup> MHC-I. Results are presented as numbers of IFN- $\gamma$ -secreting cells per 10<sup>6</sup> splenocytes, after subtracting the mean number of spots obtained in the absence of peptide or cells. (D) Splenocytes (2 × 10<sup>5</sup>/wells) of C57BL/6 mice previously immunized with either PBS/CpG/HSV/IFA or 33-41NP mixed in CpG/HSV/IFA were restimulated on day 14 with 33-41NP (10 μg/ml) or CD11b<sup>+</sup> microglia (3 × 10<sup>4</sup>/wells) isolated from the brain of WT or APPPS1 mice. Mean ± SEM (three to four mice/group). Results are representative of two independent experiments. Mann-Whitney U test, \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.01



**Fig. 5** Immunization of C57BL/6 mice with NP peptides triggers specific and functional cytotoxic cells. Spleen cells from mice immunized with PBS/CpG/HSV/IFA or with the indicated NP peptides mixed in CpG/HSV/IFA were restimulated for 5 days with matching NP peptides (10 μg/ml). In the case of immunization with PBS/CpG/HSV/IFA, splenocytes were restimulated with each of the NP peptides. Various concentrations of immune effectors specific for 23-31NP or 33-41NP were incubated for 4 h in the presence of <sup>51</sup>Cr-labeled peptide-loaded RMA5 cells (10<sup>5</sup> cells/wells) or of <sup>51</sup>Cr-labeled 1C11 cells (2 × 10<sup>4</sup>/wells). In the case of immunization with PBS/CpG/HSV/IFA, splenocytes were incubated with one or the other peptide-loaded RMA5 cells or medium alone. Results are reported as the percentage of cytotoxicity calculated as described in Methods section. Results are representative of two independent experiments

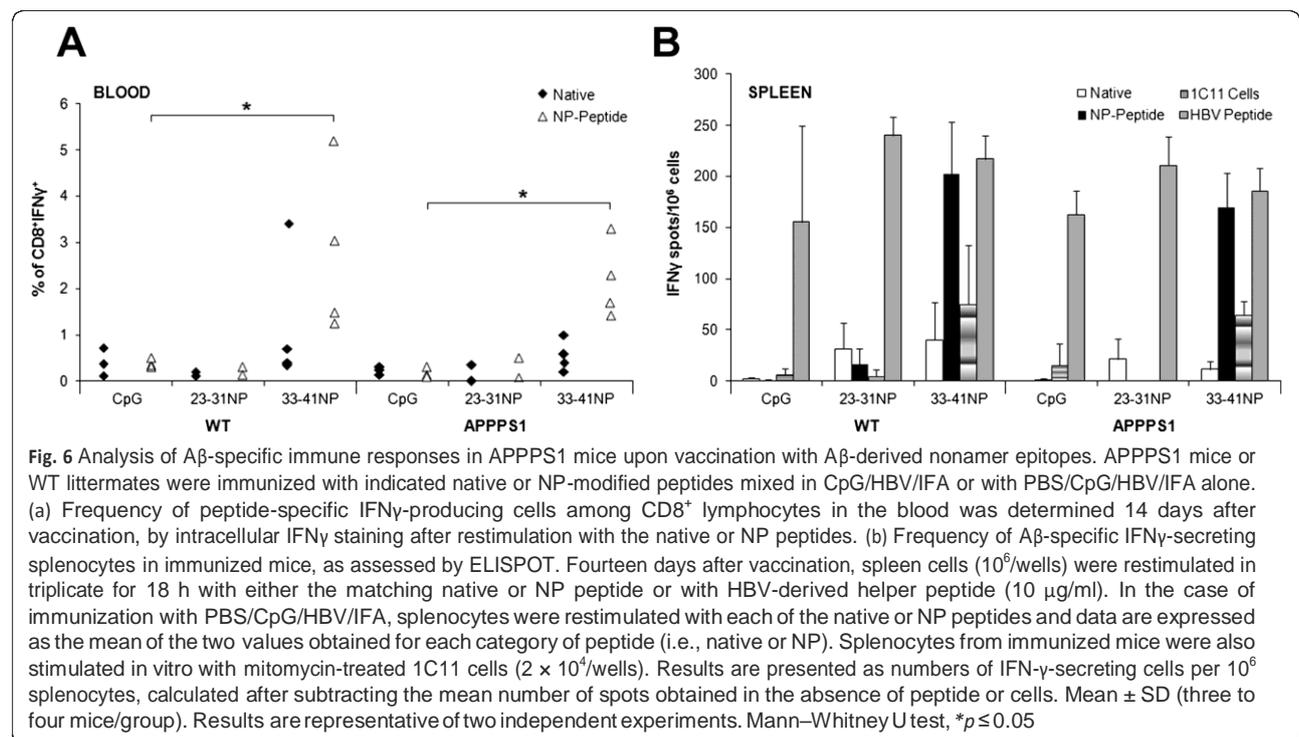
CD8<sup>+</sup> T cells was measured in the blood 12–14 days post immunization. Results depicted in Fig. 6a show that a significant percentage of CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells was observed in the blood of both APPPS1 and WT mice immunized with 33-41NP ( $p < 0.01$ ) but not in 23-31NP-immunized mice, compared to mice receiving only CpG. Whereas such responses were observed upon *in vitro* restimulation with NP peptides, only low and non-significant responses were detected after restimulation with the native peptides. ELISPOT assay further showed that immunization with 33-41NP but not with 23-31NP was able to elicit *in vivo* A $\beta$ -specific IFN $\gamma$ -secreting splenocytes in both APPPS1 mice and WT littermates. These cells recognized *in vitro* the matching NP peptide or the endogenously processed epitope in 1C11 neuronal cells but did not recognize the native peptide when loaded exogenously (Fig. 6b). Of note, immunized APPPS1 and WT mice similarly responded to the A $\beta$ -unrelated CD4<sup>+</sup> helper epitope. These results confirm that A $\beta$ 33-41NP was able to activate peripheral A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells in APPPS1 mice.

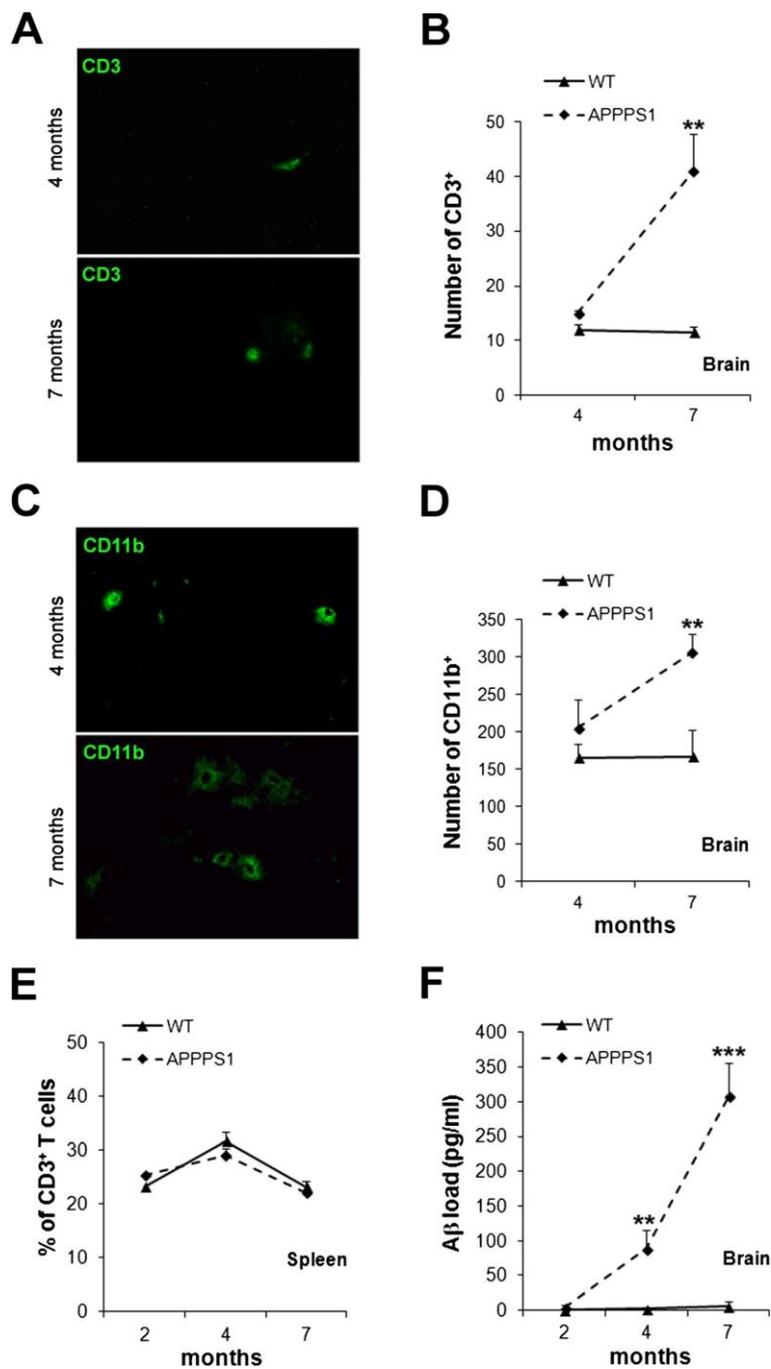
#### A $\beta$ 33-41NP specifically promotes CD8<sup>+</sup> T cell infiltration into the brain of APPPS1 mice without triggering encephalitis

The magnitude of T cell infiltration and CD11b immunoreactivity in the brain was evaluated as a function of age in APPPS1 as compared to WT mice. Immunohistochemistry analyses showed that the number of CD3<sup>+</sup> T

cells significantly increased ( $p = 0.01$ ) in the brain of APPPS1 mice between 4 and 7 months of age. In contrast, only moderate T cell infiltration was observed with aging in the brain of WT littermates (Fig. 7a, b). The number of CD11b<sup>+</sup> cells remains constant in the brain of WT mice, whereas it significantly increases ( $p = 0.02$ ) between 4 and 7 months of age in APPPS1 mice (Fig. 7c, d), in line with the described microgliosis associated with A $\beta$  deposition in this model [22]. The progressive accumulation of CD3<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells in the brain of APPPS1 mice parallels the significant ( $p = 0.001$ ) A $\beta$  deposition measured by ELISA (Fig. 7f). Of note, no differences in the percentages of CD3<sup>+</sup> cells were detected in the spleen of APPPS1 and WT mice whatever the age (Fig. 7e). These observations suggested that recruitment and/or local accumulation of CD3<sup>+</sup> T cells and CD11b<sup>+</sup> mononuclear phagocytes in the brain of APPPS1 mice is related to disease development.

To evaluate if peripherally activated A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells specifically infiltrate the brain upon vaccination, APPPS1 and WT mice were immunized twice at 1-month interval with either 33-41NP or 23-31NP as a control peptide. Cells positive for CD3 and/or CD8 markers were then quantified in the brain 2–3 weeks after the last immunization. Higher numbers of CD3<sup>+</sup> T cells previously observed in the brain of untreated APPPS1 mice as compared to age-matched WT littermates were related to an increase in both CD8<sup>-</sup> ( $p = 0.018$ ) and CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.04$ ) T cells. Importantly, CD8<sup>-</sup> cells always predominate over

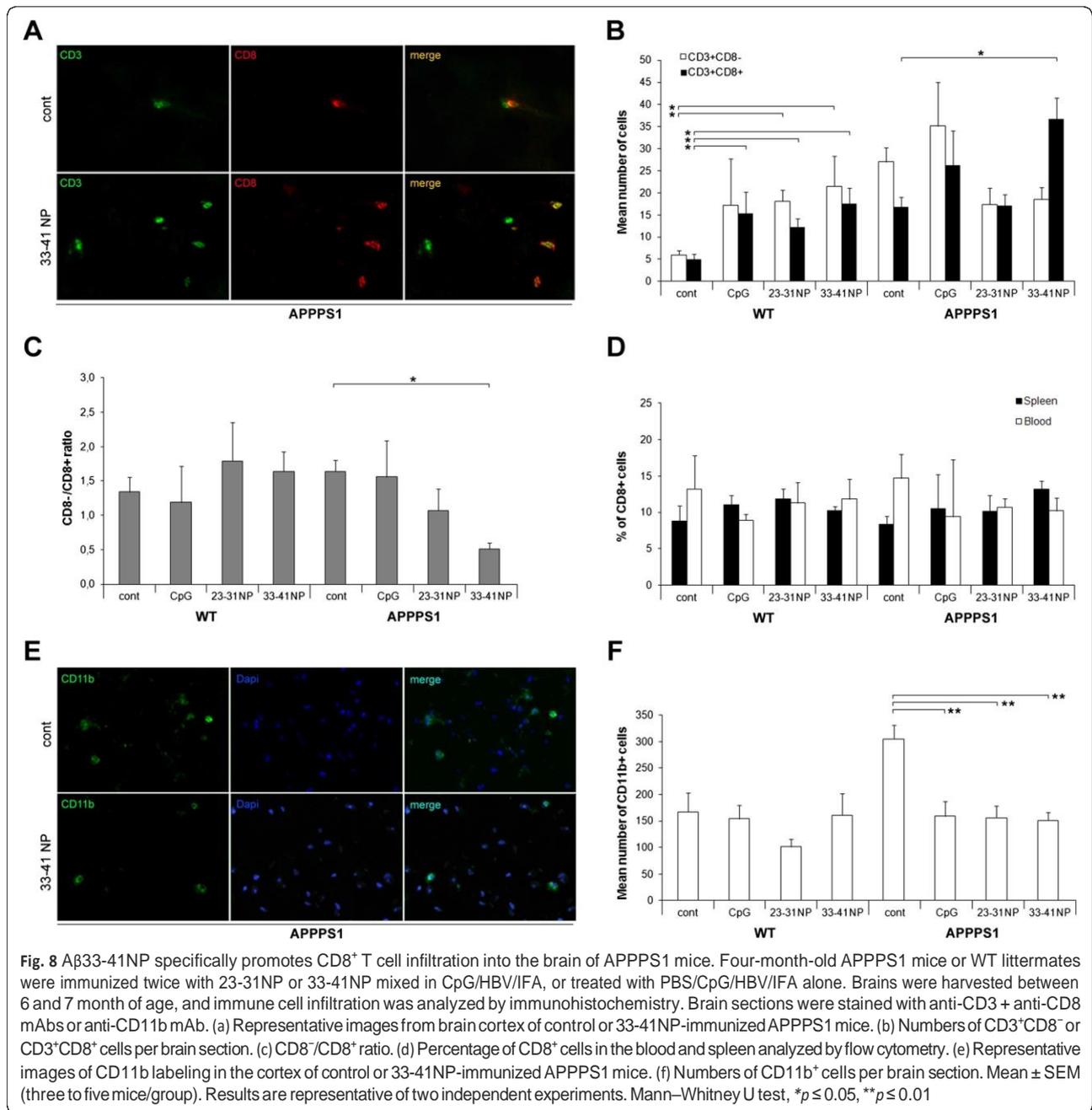




**Fig. 7** Comparative analysis of immune populations in APPPS1 and WT mice between 4 and 7 months of age. Representative images from brain cortex of APPPS1 mice (a, c) and numbers of CD3<sup>+</sup> T cells (b) or CD11b<sup>+</sup> cells (d) in the brain parenchyma of WT and APPPS1 mice. (e) Percentage of CD3<sup>+</sup> T cells in the spleen analyzed by flow cytometry. (f) Quantification by ELISA of Aβ load in the brain. Mean ± SD (three to five mice/group). Results are representative of two independent experiments. Mann–Whitney U test, \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$

CD8<sup>+</sup> cells in both APPPS1 and WT mice (Fig. 8a, b). A significantly enhanced infiltration ( $p < 0.01$ ) of both CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells was detected into the brain of WT mice following immunization with CpG + CD4<sup>+</sup> helper epitope, whether or not it was mixed with

the CD8<sup>+</sup> peptides (Fig. 8b). In contrast, the number of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells selectively increased in the brain parenchyma of APPPS1 mice after vaccination with 33-41NP (36.7±4.8;  $p = 0.057$ ) but not with 23-31NP (17.1±2.5) as compared to untreated animals (16.8±2.2)



(Fig. 8a, b). The number of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells decreased in the brain of APPPS1 mice immunized with 33-41NP (18.6±/−2.6) and 23-31NP (17.3±/−3.7), although not significantly as compared to untreated mice (27.0±/−3.2). Of note, numbers of both CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells are slightly increased after CpG treatment alone. Analysis of CD8<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> ratios confirmed that CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells predominate over CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells into the brain in all immunizing conditions including CpG alone, except for APPPS1 mice immunized with 33-41NP (CD8<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> = 0.57)

(Fig. 8c). No significant differences in the overall percentage of CD8<sup>+</sup> cells were observed in either the spleen or blood of WT and APPPS1 mice after any type of immunizations, suggesting a brain-restricted enhancement of CD8<sup>+</sup> T cell recruitment in 33-41NP-immunized APPPS1 mice (Fig. 8d).

Variations in the number of CD11b<sup>+</sup> cells upon immunization were also evaluated in the brain of WT and APPPS1 mice (Fig. 8e, f). In accordance with Aβ-related microgliosis, untreated APPPS1 mice display

significantly higher numbers of CD11b<sup>+</sup> cells than WT mice. Of note, whereas immunization with CpG, 23-31NP, or 33-41NP induced no modification in WT mice, it significantly reduces ( $p < 0.01$ ) the number of CD11b<sup>+</sup> mononuclear phagocytes in the brain parenchyma of APPPS1, leading to similar numbers as in age-matched WT mice (Fig. 8e, f).

Importantly, despite peripheral activation of A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic effectors and enhanced infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells into the brain of A $\beta$ 33-41NP-immunized APPPS1 mice, no clinical signs (e.g., kyphosis, paraplegia) of severe autoimmune neuroinflammation were observed. Altogether, these results suggest that vaccine-induced A $\beta$ 33-41NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells preferentially and selectively accumulate into the brain parenchyma of APPPS1 mice at later disease stages associated with increased A $\beta$  deposition, without triggering encephalitis nor severe brain damages.

## Discussion

The development of meningoencephalitis in some AD patients following A $\beta$  vaccination (AN1792) was sought to involve pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells [7, 8]. In this work, using mouse models, we address the possible implication of auto-aggressive A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells in the development of these severe side effects. In contrast to MHC-II-restricted epitopes, the length of peptides able to bind MHC-I molecules is precisely determined by biochemical constraints. Consequently, the array of potential MHC-I-restricted epitopes derived from a small Ag like A $\beta$ 1-42 is rather limited, which might explain why only 6 % of patients developed severe adverse effects following A $\beta$  vaccination [6]. In silico analyses using BIMAS predictive algorithm suggested that A $\beta$  might give rise to MHC-I-restricted epitopes in approximately 30 % of class I HLA alleles, including HLA-A2.1 (Table 1). We first sought to validate in HLA-Tg mice the capacity of such A $\beta$ -derived epitopes to recruit CD8<sup>+</sup> T cell responses. Yet, HLA-A2.1/HLA-DR1/H-2<sup>b/-</sup> double transgenic mice on C57BL/6 background failed to develop a functional response after immunization with A $\beta$ 16-24 candidate epitope, despite its theoretical high binding affinity for HLA-A2.1. Lack of CD8<sup>+</sup> T cell response induction may result from altered overall frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in HLA-transgenic mice, lack of natural processing of this HLA-A2.1-restricted A $\beta$ -derived epitope, or deletion of high-avidity T cells specific for dominant epitopes derived from a self-antigen.

Similarly, no A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cell response was obtained in regular C57BL/6 mice upon vaccination with A $\beta$ . In contrast to our prediction studies for class I HLA alleles, in silico predictive analyses revealed poor affinities of A $\beta$ -derived H-2-D<sup>b</sup>-restricted epitopes. A specific

approach aimed at optimizing the binding affinity and immunogenicity of these MHC-I-restricted candidate epitopes was thus required for accurately assessing the impact of A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells in response to vaccination. Optimized epitopes were engineered as previously described in various models [24, 28, 29]. Main MHC-I anchor residues of candidate epitopes were substituted by anchor residues of the NP366 reference peptide, which displays high affinity for H-2-D<sup>b</sup>, without altering TCR contact residues. Importantly, T-cell responses generated using such engineered epitopes retained their specificity for the matching native epitopes and did not recognize the reference peptide. Immunization with two such anchor-optimized epitopes, A $\beta$ 33-41NP and A $\beta$ 23-31NP, activated CD8<sup>+</sup> T cells that secrete IFN $\gamma$  and are cytotoxic towards peptide-loaded targets. However, only A $\beta$ 33-41 but not A $\beta$ 23-31 appears to be naturally processed and presented to immune effectors by a neuronal cell line expressing both APP and H-2<sup>b</sup> MHC-I molecules [25, 26] as well as by brain-derived CD11b<sup>+</sup> microglia isolated from APPPS1 mice. Of note, although neuronal cells, microglia, or other APCs such as dendritic cells (data not shown) efficiently present the endogenous peptide, A $\beta$ 33-41 native peptide could not restimulate A $\beta$ 33-41NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells when loaded exogenously. These data suggest that full endogenous machinery for antigen processing and presentation, including chaperone activities, is critically required for efficient presentation of potential low-affinity cryptic epitopes from pathogenic antigens. In contrast, when provided exogenously, such weak epitopes are likely very poorly efficient at replacing antigenic peptides from pre-formed MHC/peptide complexes at cell surface.

Immunization of APPPS1 mice with the anchor-optimized A $\beta$ 33-41NP peptide efficiently stimulated A $\beta$ -specific CD8<sup>+</sup> T cells in such C57BL/6-based mouse model of AD. Importantly, similar numbers of IFN $\gamma$ -secreting CD8<sup>+</sup> T cells were observed in the periphery of both APPPS1 and WT littermates following vaccination, ruling out an overall immunosuppressive environment in the context of AD. Our study does not confirm previous reports suggesting that APP overexpression in transgenic mice might be associated with impaired A $\beta$ -specific adaptive immunity [30]. In contrast, our data are consistent with studies showing increased frequencies of A $\beta$ -reactive T cells in the blood of both healthy elderly and patients with AD, as compared to younger healthy adults [12].

Several studies reported that the brain is continuously monitored by memory T cells, whereas only few naïve CD3<sup>+</sup> T cells gain access to the brain in healthy individuals [31]. We found that numbers of CD3<sup>+</sup> T cells significantly increase with age in the brain of APPPS1

mice. This augmentation reflected enhanced infiltration of both CD8<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> populations, with a predominance of CD8<sup>-</sup> over CD8<sup>+</sup> cells. In the same line, increased numbers of T cells have been described in the brain parenchyma of AD patients, mostly in the hippocampus [32]. Importantly, inverted CD8<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio with a predominance of CD8<sup>+</sup> over CD8<sup>-</sup> cells was selectively observed in the brain of APPPS1 but not WT mice after Aβ<sub>33-41</sub>NP immunization. These data suggest that such intracerebral accumulation of CD8<sup>+</sup> T cells specifically occurs in the context of AD and depends on specific antigen expression, as supported by the capacity of brain-derived CD11b<sup>+</sup> microglia from APPPS1 but not from WT mice to activate Aβ<sub>33-41</sub>NP-specific effectors. The preferential recruitment of Aβ-specific CD8<sup>+</sup> T cells into the brain parenchyma of vaccinated APPPS1 mice is further supported by the fact that 1) induction of CD8<sup>+</sup> T cell responses specific for Aβ<sub>23-31</sub> peptide, which turned out not to be naturally processed, did not induce any change in the CD8<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio into the brain of APPPS1 mice; 2) no modification in the overall percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was observed in the blood and spleen of APPPS1 mice after immunization. Altogether, these results suggest that Aβ-specific CD8<sup>+</sup> T cells triggered by vaccination with anchor-modified epitope are specifically recruited into the brain parenchyma of APPPS1 mice. A mechanism of Ag-dependent recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells into the brain of EAE mice was previously described [33]. Our results are in line with these studies and suggest that Aβ-derived MHC-I-restricted epitopes and particularly Aβ<sub>33-41</sub> may efficiently be processed and presented by cerebral vascular endothelial cells in the brain of AD mice.

Strikingly, despite specific infiltration of the brain by functional self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells and specific antigen processing and presentation by both neuronal cells and CD11b<sup>+</sup> microglia, no clinical sign of autoimmune neuroinflammation or CNS damages was observed in Aβ<sub>33-41</sub>NP-immunized APPPS1 mice. In accordance with our data, increased numbers of CD3<sup>+</sup> cells in the hippocampus of AD patients did not parallel activation of microglia nor disease stages. T cells were found negative for CD25 and the vast majority of them was CD45RO<sup>+</sup> but CR3<sup>-</sup>, indicating that they were activated and potent cytokine producers but not fully differentiated, possibly due to insufficient stimuli or immunosuppressive environment in the brain [32]. Weak expression of MHC class I molecules on neurons [34] and/or their resistance to perforin-mediated lysis by CTLs [35] may partially account for such absence of detrimental effect of infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, the CNS parenchyma was described to constitute a particular microenvironment with potent immunoregulatory properties, especially in

the context of neuroinflammatory conditions such as AD. Astrocytes, activated microglia, and neurons can express several factors that negatively regulate T cell activation, proliferation, and cytokine production [36]. Moreover, it has been proposed that upon extravasation into the CNS, T cells primed in the periphery need to be restimulated by perivascular and/or meningeal APCs for being fully licensed before accessing the brain parenchyma [37]. The efficiency of these particular APCs at taking up Aβ and cross-presenting Aβ-derived epitopes to CD8<sup>+</sup> T cells remains unknown and may also constitute a critical parameter restraining the functionality of Aβ-specific CD8<sup>+</sup> T cells inside the brain parenchyma. Finally, we cannot rule out that altered behavior of infiltrating Aβ-specific CD8<sup>+</sup> T cells in such mouse models may rely on other specific mechanisms related to migration and functional regulation of T cells within the AD brain parenchyma, which may significantly differ between mouse and human. In this line, a critical role of IFNγ in the migration and functional outcome of Aβ-specific CD4<sup>+</sup> T cells in mouse models of AD has previously been discussed [38]. Deciphering the overall impact of such parameters on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in the context of the AD brain definitely requires further analyses. Such studies may hold the key for the development of refined mouse models of AD with optimized disease-related immunological relevance, which are of paramount importance for better understanding the pathophysiology of AD and for accurately evaluating the efficiency and safety of innovative immunotherapy approaches.

After both Aβ-specific or non-specific vaccination, the high number of CD11b<sup>+</sup> cells observed in the brain of untreated APPPS1 mice was significantly reduced to similar levels than in WT littermates. In line with recent reports, these data suggest that modulation of peripheral immunity and inflammatory status may significantly impact the magnitude and/or shaping of parenchymal neuroinflammation, including modifications in microglia phenotype and activation profile [39, 40].

In conclusion, our results do not support a role for Aβ-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the development of meningoencephalitis after Aβ immunization. Whereas functional anti-Aβ CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells can be peripherally activated and specifically recruited to the brain, immune ignorance or altered functionality of these effectors in the microenvironment of the AD brain parenchyma may be responsible for their lack of detrimental effect.

#### Abbreviations

Aβ: amyloid-β peptide; AD: Alzheimer's disease; APP: amyloid precursor protein; BIMAS: Bioinformatics and Molecular Analysis Section; HBV: hepatitis B virus core peptide; mAb: monoclonal antibody; Tg: transgenic; WT: wild type.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

MBR, GL, and GD conceived and designed the experiments. MBR, GL, CD, TC, and GD performed the experiments. MBR, GL, and GD analyzed and interpreted the data. MBR, TC, and GD wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgements**

We thank Tatiana Ledent and the staff members of the animal core facility for expert assistance with mouse husbandry. This work was supported by grants from the Neuropole de Recherche Francilien, Association France Alzheimer, Fondation de France, Université Pierre et Marie Curie, and INSERM.

Received: 4 November 2014 Accepted: 3 May 2015

Published online: 16 May 2015

**References**

- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, et al. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408:979–82.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408:982–5.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999;400:173–7.
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. 2000;6:916–9.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:8850–5.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 2005;64:1553–62.
- Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2004;14:11–20.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*. 2003;9:448–52.
- Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, et al. 11C-PIB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol*. 2010;9:363–72.
- Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;73:2061–70.
- Farlow M, Arnold SE, van Dyck CH, Aisen PS, Snider BJ, Porsteinsson AP, et al. Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012;8:261–71.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A, Krieger JI, Bar-Or A, Bitan G, et al. Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2003;112:415–22.
- Zota V, Nemirovsky A, Baron R, Fisher Y, Selkoe DJ, Altmann DM, et al. HLA-DR alleles in amyloid beta-peptide autoimmunity: a highly immunogenic role for the DRB1\*1501 allele. *J Immunol*. 2009;183:3522–30.
- Das P, Chapoval S, Howard V, David CS, Golde TE. Immune responses against Abeta1-42 in HLA class II transgenic mice: implications for Abeta1-42 immune-mediated therapies. *Neurobiol Aging*. 2003;24:969–76.
- Kutzler MA, Cao C, Bai Y, Dong H, Choe PY, Saulino V, et al. Mapping of immune responses following wild-type and mutant ABeta42 plasmid or peptide vaccination in different mouse haplotypes and HLA class II transgenic mice. *Vaccine*. 2006;24:4630–9.
- Seabrook TJ, Iglesias M, Bloom JK, Spooner ET, Lemere CA. Differences in the immune response to long term Abeta vaccination in C57BL/6 and B6D2F1 mice. *Vaccine*. 2004;22:4075–83.
- Toly-Ndour C, Lui G, Nunes MM, Bruley-Rosset M, Aucouturier P, Dorothee G. MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4+ T cell responses to amyloid-beta peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition. *J Immunol*. 2011;187:4492–500.
- Monsonogo A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:5048–53.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. 2002;25:313–9.
- Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med*. 1997;185:2043–51.
- Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, Pancre V, Auriault C, Ojcius DM, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice. *Eur J Immunol*. 2004;34:3060–9.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltz L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. 2006;7:940–6.
- Gregoire S, Logre C, Metharom P, Loing E, Chomilier J, Rosset MB, et al. Identification of two immunogenic domains of the prion protein—PrP—which activate class II-restricted T cells and elicit antibody responses against the native molecule. *J Leukoc Biol*. 2004;76:125–34.
- Tourdot S, Oukka M, Manuguerra JC, Magafa V, Vergnon I, Riche N, et al. Chimeric peptides: a new approach to enhancing the immunogenicity of peptides with low MHC class I affinity: application in antiviral vaccination. *J Immunol*. 1997;159:2391–8.
- Buc-Caron MH, Launay JM, Lamblin D, Kellermann O. Serotonin uptake, storage, and synthesis in an immortalized committed cell line derived from mouse teratocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1922–6.
- Mouillet-Richard S, Mutel V, Loric S, Tournois C, Launay JM, Kellermann O. Regulation by neurotransmitter receptors of serotonergic or catecholaminergic neuronal cell differentiation. *J Biol Chem*. 2000;275:9186–92.
- Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, et al. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J Immunol*. 2005;174:1580–6.
- Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*. 2004;113:425–33.
- Sacquin A, Chaigneau T, Defaweux V, Adam M, Schneider B, Bruley Rosset M, et al. Prolongation of prion disease-associated symptomatic phase relates to CD3+ T cell recruitment into the CNS in murine scrapie-infected mice. *Brain Behav Immun*. 2012;26:919–30.
- Monsonogo A, Maron R, Zota V, Selkoe DJ, Weiner HL. Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10273–8.
- Westermann J, Pabst R. How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells? *Immunol Today*. 1996;17:278–82.
- Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, et al. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol*. 2002;124:83–92.
- Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood–brain barrier. *J Exp Med*. 2007;204:2023–30.
- Joly E, Oldstone MB. Neuronal cells are deficient in loading peptides onto MHC class I molecules. *Neuron*. 1992;8:1185–90.
- Keane RW, Tallent MW, Podack ER. Resistance and susceptibility of neural cells to lysis by cytotoxic lymphocytes and by cytolytic granules. *Transplantation*. 1992;54:520–6.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007;28:12–8.
- Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:623–35.
- Monsonogo A, Nemirovsky A, Harpaz I. CD4 T cells in immunity and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Immunology*. 2013;139:438–46.
- Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2014;10:217–24.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:193–201.



## II. ANNEXE 2: Curriculum Vitae

### Cira DANSOKHO

Senegalese

INSERM, UMRS 938,  
Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06  
CdR Saint-Antoine  
Laboratory “Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases”  
Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France

[cira.dansokho@inserm.fr](mailto:cira.dansokho@inserm.fr), [dansokho.dialy@gmail.com](mailto:dansokho.dialy@gmail.com)

### Education

---

- Current:**                    **PhD in Immunology** defended on November 2015, Paris, FRANCE
- Supervisors:** Pierre Aucouturier and Guillaume Dorothee
- Ph.D. topic:** Role and therapeutic potential of regulatory T cells in the pathophysiology of Alzheimer’s disease
- Scholarship delivered by the French Ministry of High Education and Research
- 2011-2012 :**                    Pierre & Marie Curie University, Paris, FRANCE
- BIP (Integrative Biology and Physiology) Biology Master
- Major: Biology of Ageing
- 2010-2011 :**                    Pierre & Marie Curie University, Paris, FRANCE
- BMC (Molecular and Cell Biology) Master
- Major: Immunology
- 2009-2008 :**                    Pierre & Marie Curie University, Paris, FRANCE
- Biology bachelor’s degree

## Expertise

---

**In vivo procedures:** Certification for animal experimentation: Category C on the Federation of Laboratory Animal Science Associations ([FELASA](#)) scale for persons responsible for directing animal experiments.

**Basic Molecular Biology:** Nucleic acid extraction, synthesis, real time PCR, DNA gel electrophoresis

**Morphological analysis:** Flow cytometry experiments on BD LSRII flow cytometry systems, immunocytochemistry and immunofluorescence experiments

## Scientific Publications

---

- **CIRA DANSOKHO**, Dylla Ait-Ahmed, Cécile Toly-Ndour, Saba Aid, Thomas Chaigneau, Martin Holzenberger, Pierre Aucouturier, Guillaume Dorothee. Regulatory T cells delay disease progression in a murine model of Alzheimer's disease. *Brain, minor revisions*

- Martine Bruley Rosset, Gabrielle Lui, **CIRA DANSOKHO**, Thomas Chaigneau, Guillaume Dorothee. Vaccine-induced A $\beta$ -specific CD8+ T cells do not trigger autoimmune neuroinflammation in a murine model of Alzheimer's disease, *Journal of Neuroinflammation* 2015, 12:95 [[Link](#)].

- Véronique Thomas-Vaslin, Adrien Six, Hang-Phuong Pham, **CIRA DANSOKHO**, Wahiba Chaara, Bruno Gouritin, Bertrand Bellier, David Klatzmann. Immunodepression and Immunosuppression during aging, *Immunosuppression - Role in Health and Diseases.* , InTech, 2012. Dr. Suman Kapur (Ed.), ISBN: 978-953-51-0152-9, DOI: 10.5772/29549 [[Link](#)]

## Conference participations

---

- 4th Venusberg meeting on Neuroinflammation, Bonn, May 6-9 2015 (**Poster presentation**)

- French Society of Neurology (SFN) International meeting, Paris, October 2014 (**Poster presentation**)

- 8<sup>th</sup> symposium on Vaccinology of the French Society of Immunology (SFI), Paris, January 2013 (**Poster presentation**)

- 15th International Congress of Immunology, Milan 2013 (**Poster presentation**)

- 4<sup>th</sup> Workshop of the French Club of Neuroimmunology, Paris, October 2013: (**Oral and poster presentations**)

- Annual congress of the French Society of Immunology (SFI), Paris, November 2013 (**Oral and poster presentations**)

## Teaching, Experience and Internships

---

- 2012-2015:** **Assistant professor**, Pierre & Marie Curie University, Paris, FRANCE  
Mastering scientific information class for all university levels
- 2012** **UMRS938, CdR St-Antoine**  
Immune system, neuroinflammation and neurodegenerative diseases, Paris  
8 months internship  
Role and therapeutic potential of regulatory T cells in the pathophysiology of Alzheimer's disease
- 2011** **Immunology - Immunopathology - Immunotherapy (I3) laboratory**, Paris  
Immune system, neuroinflammation and neurodegenerative diseases, Paris  
6 months internship  
Impact of ageing on T lymphocytes diversity and development

## Grants awarded

---

**Travel Grant** awarded by the European League against Alzheimer's disease (LECMA) for the 4<sup>th</sup> Venusberg meeting on Neuroinflammation in Bonn, May 2015.

**Travel Grant** awarded by the European Federation of Immunological Societies (EFIS), for the 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Milan, August 2013

**PhD Fellowships:** French Ministry of High Education and Research, 2012.

## Social interactions

---

- Since 2014:** Member of French Society of Neurosciences
- Since 2012:** Member of French Society of Immunology
- Since 2012:** Member of Doc'Up, a PhD students association of Sorbonne-University
- Since 2011:** Active member of Soutoura Foundation, a non-profit organization helping poor and sick people Senegal. We collect donations through the organization of cultural and sportive activities.

## Referees

---

### **Dr. Guillaume Dorothee, PhD supervisor**

INSERM, UMRS 938, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06

CdR Saint-Antoine,

Team “Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases”

Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France

Mail address: [guillaume.dorothee@inserm.fr](mailto:guillaume.dorothee@inserm.fr)

Phone: +33 (0) 149.284.620

### **Pr. Pierre Aucouturier, PhD supervisor**

INSERM, UMRS 938, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06

CdR Saint-Antoine,

Team “Immune System, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases”

Hôpital St-Antoine, F-75012, Paris, France

Mail address: [pierre.aucouturier@inserm.fr](mailto:pierre.aucouturier@inserm.fr)

Phone: +33 (0) 149.284.620

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013; 14: 307-308.

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41-53.

Agrawal S, Anderson P, Durbeej M *et al.* Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006; 203: 1007-1019.

Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 1995; 8: 429-431.

Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci* 2007; 27: 9115-9129.

## B

Balducci C, Forloni G. In vivo application of beta amyloid oligomers: a simple tool to evaluate mechanisms of action and new therapeutic approaches. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 2491-2505.

Bard F, Cannon C, Barbour R *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000a; 6: 916-919.

Bard F, Cannon C, Barbour R *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 2000b; 6: 916-919.

Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A *et al.* Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35 Suppl 2: S74-S78.

Baruch K, Deczkowska A, David E *et al.* Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science* 2014; 346: 89-93.

Baruch K, Ron-Harel N, Gal H *et al.* CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013b; 110: 2264-2269.

- Baruch K, Ron-Harel N, Gal H *et al.* CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013a; 110: 2264-2269.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL *et al.* Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 795-804.
- Bayer AJ, Bullock R, Jones RW *et al.* Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* 2005; 64: 94-101.
- Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999; 27: 62-74.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W *et al.* Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2011; 134: 1293-1314.
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ *et al.* Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 486-494.
- Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- Blennow K, Zetterberg H, Fagan AM. Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006221.
- Bloem B, Poorthuis RB, Mansvelder HD. Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Front Neural Circuits* 2014; 8: 17.
- Bobinski M, de Leon MJ, Wegiel J *et al.* The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2000; 95: 721-725.
- Boche D, Zotova E, Weller RO *et al.* Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain* 2008; 131: 3299-3310.
- Boillee S, Vande VC, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006; 52: 39-59.
- Boimel M, Grigoriadis N, Loubopoulos A, Haber E, Abramsky O, Rosenmann H. Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp Neurol* 2010; 224: 472-485.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci* 2010; 30: 15927-15942.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-259.

Browne TC, McQuillan K, McManus RM, O'Reilly JA, Mills KH, Lynch MA. IFN-gamma Production by amyloid beta-specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol* 2013; 190: 2241-2251.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q *et al.* Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011; 117: 1061-1070.

Brys M, Pirraglia E, Rich K *et al.* Prediction and longitudinal study of CSF biomarkers in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 682-690.

Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 2009b; 10: 333-344.

Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 2009a; 10: 333-344.

Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ *et al.* Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci* 2005; 25: 7709-7717.

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

Burns A, Byrne EJ, Maurer K. Alzheimer's disease. *Lancet* 2002; 360: 163-165.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS *et al.* Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014a; 17: 131-143.

Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS *et al.* Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014b; 17: 131-143.

## C

Cantegreil-Kallen I, Lieberherr D, Garcia A, Cadilhac M, Rigaud AS, Flahault A. [Detection of Alzheimer's disease in general medicine: preliminary results of a Sentinelles general practitioner's network survey]. *Rev Med Interne* 2004; 25: 548-555.

Cao C, Arendash GW, Dickson A, Mamcarz MB, Lin X, Ethell DW. Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 63-70.

Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 2001; 293: 115-120.

Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA *et al.* Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008; 34: 131-144.

Castello MA, Soriano S. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Res Rev* 2014; 13: 10-12.

Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C *et al.* IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron* 2015; 85: 519-533.

Chapman PF, White GL, Jones MW *et al.* Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 1999; 2: 271-276.

Chaudhry A, Rudra D, Treuting P *et al.* CD4<sup>+</sup> regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009; 326: 986-991.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265: 1237-1240.

Chouraki V, Seshadri S. Genetics of Alzheimer's disease. *Adv Genet* 2014; 87: 245-294.

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ *et al.* Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005; 8: 79-84.

Cockrell JR, Folstein MF. Mini-Mental State Examination (MMSE). *Psychopharmacol Bull* 1988; 24: 689-692.

Convit A, de Leon MJ, Tarshish C *et al.* Specific hippocampal volume reductions in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 131-138.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.

Cowan CM, Mudher A. Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol* 2013; 4: 114.

Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM *et al.* YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010; 68: 903-912.

## D

Daborg J, Andreasson U, Pekna M *et al.* Cerebrospinal fluid levels of complement proteins C3, C4 and CR1 in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2012; 119: 789-797.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8: 752-758.

- Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204: 1257-1265.
- Deleidi M, Jaggle M, Rubino G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Front Neurosci* 2015; 9: 172.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8850-8855.
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM. Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 2002; 295: 2264-2267.
- Derecki NC, Quinlivan KM, Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 379-385.
- Derouesne C, Poitreneau J, Hugonot L, Kalafat M, Dubois B, Laurent B. [Mini-Mental State Examination: a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. Consensual French version]. *Presse Med* 1999; 28: 1141-1148.
- Di PG, Kim TW. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 284-296.
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS *et al.* Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 2002; 5: 452-457.
- Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K *et al.* Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2011; 31: 5847-5854.
- Dodel R, Rominger A, Bartenstein P *et al.* Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol* 2013; 12: 233-243.
- Doody RS, Tariot PN, Pfeiffer E, Olin JT, Graham SM. Meta-analysis of six-month memantine trials in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2007; 3: 7-17.
- Dragicevic N, Delic V, Cao C *et al.* Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells. *Neuropharmacology* 2012; 63: 1368-1379.
- Du Y, Dodel R, Hampel H *et al.* Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 2001; 57: 801-805.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007; 6: 734-746.
- Dubois B, Touchon J, Portet F, Ousset PJ, Vellas B, Michel B. ["The 5 words": a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease]. *Presse Med* 2002; 31: 1696-1699.

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

## E

El KJ, Luster AD. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 626-632.

El KJ, Toft M, Hickman SE *et al.* Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007; 13: 432-438.

Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 2012; 33: 579-589.

Ethell DW, Shippy D, Cao C *et al.* Abeta-specific T-cells reverse cognitive decline and synaptic loss in Alzheimer's mice. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 351-361.

## F

Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007; 64: 343-349.

Farina C, Aloisi F, Meinel E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007; 28: 138-145.

Ferrer I, Boada RM, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2004; 14: 11-20.

Ferri CP, Prince M, Brayne C *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366: 2112-2117.

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

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-1151.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908: 244-254.

## G

Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* 2015; 87: 47-62.

Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 2007; 28: 12-18.

Galvin JE, Powlishta KK, Wilkins K *et al.* Predictors of preclinical Alzheimer disease and dementia: a clinicopathologic study. *Arch Neurol* 2005; 62: 758-765.

Gilman S, Koller M, Black RS *et al.* Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 2005; 64: 1553-1562.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330: 841-845.

Ginhoux F, Prinz M. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7.

Goedert M, Ghetti B. Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol* 2007; 17: 57-62.

Goedert M, Spillantini MG. Pathogenesis of the tauopathies. *J Mol Neurosci* 2011; 45: 425-431.

Gold M, El KJ. beta-amyloid, microglia, and the inflammasome in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* 2015.

Goldmann T, Zeller N, Raasch J *et al.* USP18 lack in microglia causes destructive interferonopathy of the mouse brain. *EMBO J* 2015; 34: 1612-1629.

Gray CW, Patel AJ. Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta in astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1993; 19: 251-256.

Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR *et al.* Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 2013; 78: 631-643.

Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S *et al.* IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010; 207: 1871-1878.

Grober E, Buschke H, Crystal H, Bang S, Dresner R. Screening for dementia by memory testing. *Neurology* 1988; 38: 900-903.

Groux H, O'Garra A, Bigler M *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742.

Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D *et al.* Il10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron* 2015; 85: 534-548.

## H

Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 2004; 23: 483-488.

Haass C, Hung AY, Selkoe DJ. Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 1991; 11: 3783-3793.

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 383-388.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-185.

Hatterer E, Touret M, Belin MF, Honnorat J, Nataf S. Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions. *PLoS One* 2008; 3: e3321.

Hauben E, Nevo U, Yoles E *et al.* Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 2000; 355: 286-287.

Haynes SE, Hoppel G, Yang G *et al.* The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1512-1519.

Heber S, Herms J, Gajic V *et al.* Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 2000; 20: 7951-7963.

Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA *et al.* Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* 1995; 273: 1354-1359.

Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 2015a; 16: 229-236.

Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 2015b; 16: 229-236.

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013a; 493: 674-678.

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A *et al.* NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013b; 493: 674-678.

Heppner FL, Greter M, Marino D *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005; 11: 146-152.

Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009; 8: 382-397.

Ho L, Fukuchi K, Younkin SG. The alternatively spliced Kunitz protease inhibitor domain alters amyloid beta protein precursor processing and amyloid beta protein production in cultured cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 30929-30934.

Hock C, Konietzko U, Streffer JR *et al.* Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 2003; 38: 547-554.

Holmes A, Wrenn CC, Harris AP, Thayer KE, Crawley JN. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav* 2002; 1: 55-69.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D *et al.* Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 2008; 372: 216-223.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* 2011; 77: 212-218.

Holmes C, Cunningham C, Zotova E *et al.* Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 73: 768-774.

Hu N, Yu JT, Tan L, Wang YL, Sun L, Tan L. Nutrition and the risk of Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 524820.

Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A *et al.* Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999; 52: 1555-1562.

Hyman BT, Smith C, Buldyrev I *et al.* Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; 49: 808-810.

## I

Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx* 2004; 1: 226-234.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F *et al.* Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 2010; 142: 387-397.

## J

Jacobs JF, Punt CJ, Lesterhuis WJ *et al.* Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5067-5078.

James OG, Doraiswamy PM, Borges-Neto S. PET Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Front Neurol* 2015; 6: 38.

Janus C, Pearson J, McLaurin J *et al.* A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 979-982.

Jay TR, Miller CM, Cheng PJ *et al.* TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 2015; 212: 287-295.

Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S *et al.* Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 107-116.

Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013; 501: 45-51.

Jun G, Ibrahim-Verbaas CA, Vronskaya M *et al.* A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein. *Mol Psychiatry* 2015.

## K

Karlstetter M, Nothdurfter C, Aslanidis A *et al.* Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 3.

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173: 2353-2361.

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

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011; 91: 461-553.

Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 663-669.

Kirkwood TB. A systematic look at an old problem. *Nature* 2008; 451: 644-647.

Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci* 2002; 22: 698-707.

Kleinberger G, Yamanishi Y, Suarez-Calvet M *et al.* TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* 2014; 6: 243ra86.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A *et al.* Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55: 306-319.

Klyubin I, Betts V, Welzel AT *et al.* Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci* 2008; 28: 4231-4237.

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10: 595-602.

Kohm AP, McMahon JS, Podojil JR *et al.* Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 2006; 176: 3301-3305.

Koreth J, Matsuoka K, Kim HT *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 2055-2066.

Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N *et al.* IFN-gamma-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain* 2013; 136: 3427-3440.

Kurz A, Altland K, Lautenschlager N *et al.* Apolipoprotein E type 4 allele and Alzheimer's disease: effect on age at onset and relative risk in different age groups. *J Neurol* 1996; 243: 452-456.

## L

Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V *et al.* Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis* 2010; 20: 1107-1118.

- Lambert JC, Heath S, Even G *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2009; 41: 1094-1099.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2013a; 45: 1452-1458.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2013b; 45: 1452-1458.
- Larbi A, Pawelec G, Witkowski JM *et al.* Dramatic shifts in circulating CD4 but not CD8 T cell subsets in mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 17: 91-103.
- Laurent C, Eddarkaoui S, Derisbourg M *et al.* Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging* 2014; 35: 2079-2090.
- Laursen B, Mork A, Plath N, Kristiansen U, Bastlund JF. Cholinergic degeneration is associated with increased plaque deposition and cognitive impairment in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice. *Behav Brain Res* 2013; 240: 146-152.
- Leboucher A, Laurent C, Fernandez-Gomez FJ *et al.* Detrimental effects of diet-induced obesity on tau pathology are independent of insulin resistance in tau transgenic mice. *Diabetes* 2013; 62: 1681-1688.
- Lee JH, Oh ES, Jeong SH, Sohn EH, Lee TY, Lee AY. Longitudinal changes in clock drawing test (CDT) performance according to dementia subtypes and severity. *Arch Gerontol Geriatr* 2011; 53: e179-e182.
- Lee S, Varvel NH, Konerth ME *et al.* CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol* 2010; 177: 2549-2562.
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V *et al.* Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 2013; 8: 2531-2537.
- Lemere CA, Spooner ET, LaFrancois J *et al.* Evidence for peripheral clearance of cerebral Abeta protein following chronic, active Abeta immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis* 2003; 14: 10-18.
- Lesne S, Ali C, Gabriel C *et al.* NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci* 2005; 25: 9367-9377.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293: 1487-1491.
- Liu S, Liu Y, Hao W *et al.* TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol* 2012; 188: 1098-1107.
- Liu X, Li H, Zhong B *et al.* USP18 inhibits NF-kappaB and NFAT activation during Th17 differentiation by deubiquitinating the TAK1-TAB1 complex. *J Exp Med* 2013; 210: 1575-1590.
- Lleo A, Saura CA. gamma-secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 1513-1527.

London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 34.

Lopez-Toledano MA, Shelanski ML. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* 2004; 24: 5439-5444.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; 523: 337-341.

Lu T, Aron L, Zullo J *et al.* REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 2014; 507: 448-454.

Lueg G, Gross CC, Lohmann H *et al.* Clinical relevance of specific T-cell activation in the blood and cerebrospinal fluid of patients with mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2015; 36: 81-89.

Luo Y, Bolon B, Kahn S *et al.* Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 231-232.

Ly PT, Wu Y, Zou H *et al.* Inhibition of GSK3beta-mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J Clin Invest* 2013; 123: 224-235.

## M

Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 453-479.

Malik M, Parikh I, Vasquez JB *et al.* Genetics ignite focus on microglial inflammation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2015; 10: 52.

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 13.

Masliah E, Hansen L, Adame A *et al.* Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 64: 129-131.

Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Combination therapy with cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015; 18.

Matsuoka K, Koreth J, Kim HT *et al.* Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* 2013; 5: 179ra43.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H *et al.* 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. *Alzheimers Dement* 2011; 7: 263-269.
- MEDAWAR PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58-69.
- Menting KW, Claassen JA. beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 165.
- Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 841-855.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 1999; 5: 49-55.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X *et al.* Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8025-8030.
- Monsonogo A, Imitola J, Petrovic S *et al.* Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5048-5053.
- Monsonogo A, Zota V, Karni A *et al.* Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2003; 112: 415-422.
- Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD *et al.* Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 2015; 85: 296-302.
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE *et al.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000; 408: 982-985.
- Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43: 2412-2414.
- Morris JC, Storandt M, Miller JP *et al.* Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2001; 58: 397-405.
- Muller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2008; 85: 393-406.
- Muller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012a; 2: a006288.
- Muller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012b; 2: a006288.
- Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 641-651.

Murphy JB, Sturm E. CONDITIONS DETERMINING THE TRANSPLANTABILITY OF TISSUES IN THE BRAIN. *J Exp Med* 1923; 38: 183-197.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; 41: 14-20.

## N

Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A *et al.* Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 1997; 387: 500-505.

Nalivaeva NN, Belyaev ND, Kerridge C, Turner AJ. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 235.

Nath A, Hall E, Tuzova M *et al.* Autoantibodies to amyloid beta-peptide (Abeta) are increased in Alzheimer's disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med* 2003; 3: 29-39.

Neumann PJ, Araki SS, Arcelus A *et al.* Measuring Alzheimer's disease progression with transition probabilities: estimates from CERAD. *Neurology* 2001; 57: 957-964.

Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003; 9: 448-452.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318.

## O

Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF *et al.* Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 2003; 61: 46-54.

## P

- Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 2010; 13: 812-818.
- Panda A, Arjona A, Sapey E *et al.* Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009; 30: 325-333.
- Pankratz VS, Roberts RO, Mielke MM *et al.* Predicting the risk of mild cognitive impairment in the Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology* 2015; 84: 1433-1442.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 2011; 333: 1456-1458.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 2013; 155: 1596-1609.
- Pereira A, Jr., Furlan FA. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol* 2010; 92: 405-420.
- Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 2004; 256: 183-194.
- Petersen RC, Caracciolo B, Brayne C, Gauthier S, Jelic V, Fratiglioni L. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *J Intern Med* 2014; 275: 214-228.
- Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 2011; 10: 253-263.
- Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Scafidi V, Di CM. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 780179.
- Pinchuk LM, Filipov NM. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun Ageing* 2008; 5: 1.
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 5531-5535.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I *et al.* A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004; 113: 1456-1464.
- Preece P, Virley DJ, Costandi M *et al.* Amyloid precursor protein mRNA levels in Alzheimer's disease brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 122: 1-9.
- Prickaerts J, van Goethem NP, Chesworth R *et al.* EVP-6124, a novel and selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, improves memory performance by potentiating the acetylcholine response of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1099-1110.

Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldridge J, Black RS. Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. *Neurodegener Dis* 2008; 5: 194-196.

Prinz M, Schmidt H, Mildner A *et al.* Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008; 28: 675-686.

Prodinger C, Bunse J, Kruger M *et al.* CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* 2011; 121: 445-458.

## R

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA *et al.* Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 2006; 7: 940-946.

Radjavi A, Smirnov I, Kipnis J. Brain antigen-reactive CD4+ T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. *Brain Behav Immun* 2014; 35: 58-63.

Raghavan N, Samtani MN, Farnum M *et al.* The ADAS-Cog revisited: novel composite scales based on ADAS-Cog to improve efficiency in MCI and early AD trials. *Alzheimers Dement* 2013; 9: S21-S31.

Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 2012; 122: 1164-1171.

Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012c; 12: 623-635.

Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012b; 12: 623-635.

Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2012a; 12: 623-635.

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119-145.

Raposo C, Graubardt N, Cohen M *et al.* CNS repair requires both effector and regulatory T cells with distinct temporal and spatial profiles. *J Neurosci* 2014; 34: 10141-10155.

Ray S, Britschgi M, Herbert C *et al.* Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 2007; 13: 1359-1362.

Rembach A, Stingo FC, Peterson C *et al.* Bayesian graphical network analyses reveal complex biological interactions specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2015; 44: 917-925.

Reynolds AD, Banerjee R, Liu J, Gendelman HE, Mosley RL. Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1083-1094.

Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW *et al.* Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2011; 31: 700-711.

Rogers K, Felsenstein KM, Hrdlicka L *et al.* Modulation of gamma-secretase by EVP-0015962 reduces amyloid deposition and behavioral deficits in Tg2576 mice. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 61.

Rosenkranz D, Weyer S, Tolosa E *et al.* Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 2007a; 188: 117-127.

Rosenkranz D, Weyer S, Tolosa E *et al.* Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 2007b; 188: 117-127.

Rosenmann H, Grigoriadis N, Karussis D *et al.* Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Arch Neurol* 2006a; 63: 1459-1467.

Rosenmann H, Meiner Z, Geylis V, Abramsky O, Steinitz M. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neurosci Lett* 2006b; 410: 90-93.

Rudy CC, Hunsberger HC, Weitzner DS, Reed MN. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging Dis* 2015; 6: 131-148.

Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G *et al.* Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 971-988.

## S

Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F *et al.* Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2067-2077.

Sachs-Ericsson N, Blazer DG. The new DSM-5 diagnosis of mild neurocognitive disorder and its relation to research in mild cognitive impairment. *Aging Ment Health* 2015; 19: 2-12.

Sadlack B, Lohler J, Schorle H *et al.* Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3053-3059.

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; 75: 253-261.

Saederup N, Cardona AE, Croft K *et al.* Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 2010; 5: e13693.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010b; 10: 490-500.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010a; 10: 490-500.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995a; 155: 1151-1164.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995b; 155: 1151-1164.

Salloway S, Sperling R, Fox NC *et al.* Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2014; 370: 322-333.

Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 2014; 158: 15-24.

Saresella M, Calabrese E, Marventano I *et al.* PD1 negative and PD1 positive CD4+ T regulatory cells in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 21: 927-938.

Scarmeas N, Luchsinger JA, Mayeux R, Stern Y. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality. *Neurology* 2007; 69: 1084-1093.

Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 912-921.

Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66 Suppl 1: 45-54.

Schenk D, Barbour R, Dunn W *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-177.

Schneider LS, Dagerman KS, Higgins JP, McShane R. Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2011; 68: 991-998.

Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J* 2014; 33: 7-22.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001; 81: 741-766.

Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 447-453.

Serpe CJ, Coers S, Sanders VM, Jones KJ. CD4+ T, but not CD8+ or B, lymphocytes mediate facial motoneuron survival after facial nerve transection. *Brain Behav Immun* 2003; 17: 393-402.

Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. Kinetics of facial motoneuron loss following facial nerve transection in severe combined immunodeficient mice. *J Neurosci Res* 2000; 62: 273-278.

Setiady YY, Coccia JA, Park PU. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by FcγRIII+ phagocytes. *Eur J Immunol* 2010; 40: 780-786.

Shechter R, London A, Varol C *et al.* Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med* 2009; 6: e1000113.

Shechter R, Miller O, Yovel G *et al.* Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 2013; 38: 555-569.

Siemers ER, Sundell KL, Carlson C *et al.* Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement* 2015.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7-35.

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E. Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4109-4112.

Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 452-455.

Steinberg S, Stefansson H, Jonsson T *et al.* Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2015; 47: 445-447.

Stephens LA, Anderton SM. Comment on "Cutting edge: anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". *J Immunol* 2006; 177: 2036-2038.

Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010; 11: 155-161.

Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 2004; 45: 208-212.

Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 2003; 60: 652-656.

Suffner J, Hochweller K, Kuhnle MC *et al.* Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J Immunol* 2010; 184: 1810-1820.

Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C *et al.* Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 1995; 268: 1472-1476.

Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 1219-1231.

## T

Tanaka S, Nakamura S, Ueda K *et al.* Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 472-479.

Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y *et al.* Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1406-1414.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005; 120: 545-555.

Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK *et al.* Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 2009; 66: 382-389.

Tarawneh R, Head D, Allison S *et al.* Cerebrospinal Fluid Markers of Neurodegeneration and Rates of Brain Atrophy in Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 2015; 72: 656-665.

Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 317-324.

Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I *et al.* Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 250-260.

Togo T, Akiyama H, Iseki E *et al.* Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 2002; 124: 83-92.

Toly-Ndour C, Lui G, Nunes MM, Bruley-Rosset M, Aucouturier P, Dorothee G. MHC-independent genetic factors control the magnitude of CD4<sup>+</sup> T cell responses to amyloid-beta peptide in mice through regulatory T cell-mediated inhibition. *J Immunol* 2011; 187: 4492-4500.

Troquier L, Caillierez R, Burnouf S *et al.* Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 397-405.

Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 1-32.

## V

Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cunningham DD. Protease nexin-II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein. *Science* 1990; 248: 745-748.

Varma VR, Chuang YF, Harris GC, Tan EJ, Carlson MC. Low-intensity daily walking activity is associated with hippocampal volume in older adults. *Hippocampus* 2015; 25: 605-615.

Vernooij MW, van der LA, Ikram MA *et al.* Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: the Rotterdam Scan Study. *Neurology* 2008; 70: 1208-1214.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523-532.

Villeda SA, Luo J, Mosher KI *et al.* The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 2011; 477: 90-94.

Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC. The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 2008; 38: 1-15.

Viola KL, Klein WL. Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 183-206.

Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol* 2011; 70: 871-880.

von Koch CS, Zheng H, Chen H *et al.* Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 661-669.

# W

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535-539.

Walsh DM, Townsend M, Podlisny MB *et al.* Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. *J Neurosci* 2005; 25: 2455-2462.

Walsh JT, Hendrix S, Boato F *et al.* MHCII-independent CD4+ T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *J Clin Invest* 2015; 125: 699-714.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 2002; 924: 133-140.

Wang ZX, Tan L, Liu J, Yu JT. The Essential Role of Soluble Abeta Oligomers in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2015.

Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2013; 5: 28.

Weiner HL, Lemere CA, Maron R *et al.* Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000; 48: 567-579.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 1858-1862.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* 1995; 3: 521-530.

Wirth M, Villeneuve S, Haase CM *et al.* Associations between Alzheimer disease biomarkers, neurodegeneration, and cognition in cognitively normal older people. *JAMA Neurol* 2013; 70: 1512-1519.

Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11213-11218.

Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N *et al.* GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 4503-4515.

Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS *et al.* Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1291: 1-13.

Wong PC, Cai H, Borchelt DR, Price DL. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 2002; 5: 633-639.

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC *et al.* Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 2003; 9: 453-457.

## Z

Zhang B, Gaiteri C, Bodea LG *et al.* Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 2013; 153: 707-720.

Zhao W, Beers DR, Liao B, Henkel JS, Appel SH. Regulatory T lymphocytes from ALS mice suppress microglia and effector T lymphocytes through different cytokine-mediated mechanisms. *Neurobiol Dis* 2012; 48: 418-428.

Zheng H. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. 2011.

Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+. *J Immunol* 2007; 178: 2018-2027.

Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M *et al.* Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid-beta42 immunization. *Brain* 2013; 136: 2677-2696.

Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 248-256.